

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Fisiología**



**FUNCIÓN DEL CALCIO EN LA REGULACIÓN  
VASCULAR PENEANA Y SU IMPLICACIÓN EN  
LA VASCULOPATÍA DIABÉTICA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Nuria Villalba Isabel**

Bajo la dirección de los doctores

Dolores Prieto Ocejo  
Albino García Sacristán

**Madrid, 2010**

**ISBN: 978-84-693-9255-3**

© Nuria Villalba Isabel, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



FUNCIÓN DEL CALCIO EN LA REGULACIÓN  
VASCULAR PENEANA Y SU IMPLICACIÓN  
EN LA VASCULOPATÍA DIABÉTICA

TESIS DOCTORAL

NURIA VILLALBA ISABEL

Madrid, 2010





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

SECCION DEPARTAMENTAL DE FISIOLOGIA ANIMAL

Dolores Prieto Ocejo, Profesora Titular de Fisiología, y Albino García Sacristán, Catedrático de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que **D<sup>a</sup> Nuria Villalba Isabel**, Licenciada en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, el trabajo de investigación titulado “**Función del calcio en la regulación vascular peneana y su implicación en la vasculopatía diabética**” para optar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Mayo de 2010

Dra. Dolores Prieto Ocejo

Prof. Dr. Albino García-Sacristán





*A mis Padres,  
mi ejemplo*

*A mi hermana,  
a quien adoro*



*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa”  
Mahatma Gandhi*



## *AGRADECIMIENTOS*

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Dolores Prieto Ocejo, directora de este trabajo, por la supervisión del mismo y por el tiempo que me ha dedicado durante estos años, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Al Prof. Dr. Albino García Sacristán, co-director del mismo, por brindarme la oportunidad de entrar a formar parte de este equipo de investigación. Muchas gracias por su cariño y permitirme iniciarme en el mundo de la ciencia, así como por los comentarios y correcciones tan acertados de esta tesis.

A los profesores del departamento, mis profesores durante la carrera, quienes me han ayudado siempre que se lo he solicitado y han compartido cada día conmigo sus conocimientos colaborando así en mi formación. Muchas gracias por todo lo que me habéis aportado.

A la Dra. Ana Sánchez, una excelente compañera y mejor persona, gracias por tu ayuda y tu cariño. A Cristina Contreras, siempre tan dispuesta a ayudar, ¡eres la próxima!

Al Prof. Dr. Ulf Simonsen, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Aarhus, Dinamarca, así como por su apoyo y sabios consejos que aún hoy tengo presentes. Muchas gracias por todo el tiempo dedicado y que sigues dedicando. También, quiero agradecer al Dr. Edgaras Stankevicius, por la supervisión de mi trabajo durante mi estancia en Dinamarca; al Dr. Attila Kun por su ayuda incondicional a nivel personal y profesional, un trabajador nato y una excelente persona. A Helle Zibrandtsen, con quien fue un placer trabajar y por ayudarme a sacar un proyecto adelante. A Heidi Knudsen por su ayuda en todo lo relacionado con el día a día en el laboratorio.

A la Profa. Dra. Mercedes Salaices, catedrática del Departamento de Farmacología de la Universidad Autónoma de Madrid, por poner a mi disposición todos los medios necesarios para realizar algunos experimentos de mi tesis: muchas gracias; a la Dra. Ana Briones, por la supervisión de mi trabajo y el tiempo que dedicaste a mis dudas y preguntas; quiero agradecer también a las personas que considero también mis compañeras, porque me hicieron sentir así en la UAM: a las Dras. Ana Belén García, Marta de Miguel y Amada Beltrán; y a las licenciadas Marisol Fernández y Fernanda Roque por su ayuda en todo momento.

A Don Francisco Puente y Don Manuel Perales, por el cuidado diario de los animales y su gran apoyo técnico.

A Dña. Macarena Martín Zapatero, por su constante ayuda, más que eficiente y sin duda una secretaria excelente.

Por supuesto, no quiero olvidarme de Raquel, por su valiosa amistad, un ejemplo para mí de capacidad de superación y esfuerzo. Gracias por tu cariño, por tus cientos de e-mails y por preocuparte tanto por mí durante este tiempo.

A Ana, porque parte de esta tesis la hice cuando estuvimos juntas en Dinamarca. Muchísimas gracias por tu ayuda tanto allí como en la UAM, por los buenos momentos que compartimos y por escucharme siempre mis agobios.

A Pedro, por las horas que ha dedicado a realizar la versión digital de mi tesis y en el diseño de la portada, sin duda nadie la podía haber hecho mejor. Gracias por “abstraerme” de la ciencia cuando más lo he necesitado y por tu ayuda aportándome una visión diferente y positiva de las cosas.

Por último, quisiera dedicar esta tesis a mi familia:

A mi padre, de quien he aprendido que la fuerza y la entrega son suficientes para conseguir las cosas. A mi madre, perfeccionista, trabajadora y positiva como nadie. Sin vosotros no hubiera podido llegar hasta aquí. Gracias

por alentarme a hacer lo que quiero, por vuestro amor y por ayudarme a conseguir mis metas. Os quiero.

A mi hermana, mi segunda madre, mi compañera, mi amiga. Gracias por compartir conmigo tantas cosas, por consentirme tanto, por tus abrazos. Porque siempre me das lo mejor: te quiero mucho.

A mis abuelos, por su cariño, sé que ellos comparten mi alegría.





Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2006-09191). Nuria Villalba Isabel ha disfrutado de una beca predoctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia; asimismo, ha contado con la financiación de la Danish Cardiovascular Research Academy (DaCRA).



## ABREVIATURAS

$\alpha_1$ -AR	Adrenoceptores $\alpha_1$
$\alpha_2$ -AR	Adrenoceptores $\alpha_2$
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de $Ca^{2+}$ intracelular
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
ACh	Acetilcolina
AMP <sub>c</sub>	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
Calmodulina	CaM
CCR	Curva concentración-respuesta
CE	Cuerpo esponjoso
CICR	Liberación de $Ca^{2+}$ inducida por $Ca^{2+}$
COX	Ciclooxigenasa
CPA	Ácido ciclopiazónico
DAG	Diacilglicerol
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
ET	Endotelina
FAD	Flavina dinucleótido
FIC	Factor de influjo de $Ca^{2+}$
GC	Guanilato ciclasa
GMP	Guanosín monofosfato
GMP <sub>c</sub>	Guanosín monofosfato cíclico
GSH	Glutación
GTP	Guanosín-5'-trifosfato
5-HT	Serotonina
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
InsP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
InsP <sub>3</sub> R	Receptor de inositol trifosfato
K <sub>ATP</sub>	Canales de K <sup>+</sup> regulados por ATP
K <sub>Ca</sub>	Canales de K <sup>+</sup> activados por $Ca^{2+}$
KPSS	Solución fisiológica rica en K <sup>+</sup>
K <sub>V</sub>	Canales de K <sup>+</sup> activados por voltaje
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MLC <sub>20</sub>	Cadena ligera de miosina
MLCK	Quinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de cadena ligera de miosina
MYPT	Subunidad reguladora de la MLCP

NA	Noradrenalina
NADPH	Adenina dinucleótido fosfato
NANC	No-adrenérgico no-colinérgico
NFK $\beta$	Factor de transcripción nuclear $\beta$
nNOS	Sintasa del óxido nítrico nerviosa
NO	Óxido nítrico
O-GlcNAc	N-acetilglucosamina
PDE-5	Fosfodiesterasa 5
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandina E <sub>1</sub>
PGES	Prostaglandina E sintasa
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandina F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PGFS	Prostaglandina F sintasa
PGH	Prostaglandina H
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
PGIS	Prostaglandina I <sub>2</sub> sintasa
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMP <sub>c</sub>
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa dependiente de GMP <sub>c</sub>
PLC	Fosfolipasa C
PSS	Solución salina fisiológica
RhoK	Quinasa Rho
ROC	Canal de Ca <sup>2+</sup> operado por receptor
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RS	Retículo sarcoplásmico
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Bomba Ca <sup>2+</sup> -ATP <sub>asa</sub> del retículo sarcoplásmico
SOC	Canal de Ca <sup>2+</sup> operado por almacén
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
TGF- $\beta$ <sub>1</sub>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ <sub>1</sub>
TRPC	Canales de potencial de receptor transitorio
TS	Tromboxano sintasa
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
VACHT	Transportador de ACh
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VOC	Canal de Ca <sup>2+</sup> operado por voltaje

## ÍNDICE



<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. FISIOLÓGIA DE LA ERECCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Regulación fisiológica del tono del tejido eréctil: vasodilatadores y vasoconstrictores .....</b>	<b>7</b>
1.1.1. Factores que intervienen en la vasorelajación-erección .....	7
1.1.2. Factores que intervienen en la vasoconstricción-flacidez .....	20
<b>2. DISFUNCIÓN ERÉCTIL Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1. Disfunción eréctil y diabetes.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Disfunción eréctil y disfunción endotelial.....</b>	<b>31</b>
2.2.1. Causas de disfunción endotelial .....	31
<b>2.3. Disfunción eréctil y enfermedad arterial coronaria.....</b>	<b>36</b>
<b>3. PAPEL FISIOLÓGICO DEL <math>Ca^{2+}</math> EN LA VASOCONSTRICCIÓN ARTERIAL .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Mecanismos de activación de la entrada de <math>Ca^{2+}</math> en el músculo liso.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Canales iónicos .....</b>	<b>40</b>
3.2.1. Entrada de $Ca^{2+}$ a través de canales operados por voltaje.....	40
3.2.1.1. Canales de $Ca^{2+}$ operados por voltaje tipo L.....	40
3.2.1.2. Canales de $Ca^{2+}$ operados por voltaje tipo T .....	45
3.2.2. Entrada de $Ca^{2+}$ a través de canales activados por receptor (ROC).....	46
3.2.2.1. Mecanismos de activación de los canales ROC .....	47
3.2.3. Canales de $Ca^{2+}$ operados por almacén (SOC).....	48
3.2.3.1. Mecanismos de activación de los SOC .....	49
3.2.4. Familia de los canales de potencial de receptor transitorio (TRP).....	50
3.2.4.1. TRPC1, 2, 4 y 5.....	52
3.2.4.2. TRPC3, 6 y 7.....	54
3.2.4.3. Entrada de $Ca^{2+}$ activada por el estiramiento.....	56
3.2.5. Identificación y papel de las proteínas STIM1 y Orai1 .....	57
<b>3.3. Implicación del <math>Ca^{2+}</math> intracelular en la vasoconstricción arterial .....</b>	<b>60</b>
3.3.1. Mecanismos de liberación de $Ca^{2+}$ intracelular.....	60
3.3.1.1. Inositol trifosfato ( $InsP_3$ ).....	60
3.3.1.2. Receptor de rianodina (RyR): entrada de $Ca^{2+}$ inducida por $Ca^{2+}$ .....	62
3.3.1.3. Regulación mitocondrial de la concentración de $Ca^{2+}$ intracelular.....	65



4. SENSIBILIZACIÓN AL $\text{Ca}^{2+}$ .....	66
4.1. Definición y mecanismos de activación.....	66
4.2. Papel de la RhoK en la regulación de la contracción del tejido eréctil.....	68
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
1. MATERIAL.....	79
1.1. Material biológico.....	79
1.1.1. Animales .....	79
1.2. Instrumentación general.....	80
1.3. Reactivos y soluciones.....	80
2. MÉTODOS .....	84
2.1. Estudios funcionales .....	84
2.1.1. Preparación y microdisección de las preparaciones arteriales .....	84
2.1.2. Montaje de las arterias.....	85
2.1.3. Normalización de las arterias.....	85
2.2. Determinación del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular por ratio-fluorometría .....	85
2.2.1. Introducción a la fluorescencia.....	85
2.2.2. Medidas simultáneas de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular y tensión isométrica .....	86
2.3. Experimentos de permeabilización de las arterias con $\alpha$ -toxina .....	88
2.4. Protocolos experimentales para los estudios funcionales .....	89
2.4.1. Protocolos experimentales realizados en ratas Wistar Kioto .....	89
2.4.1.1. Estudio de los mecanismos de $\text{Ca}^{2+}$ acoplados al receptor $\alpha_1$ -adrenérgico.....	89
2.4.1.2. Estudio de los mecanismos de $\text{Ca}^{2+}$ acoplados al receptor de $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ (TP).....	93
2.4.2. Protocolos Experimentales para los estudios funcionales realizados en ratas Zucker.....	94
2.5. Determinación por Western Blotting de proteínas de la pared arterial .....	95

2.5.1. Determinación de la expresión de la proteína TRPC6 y de la enzima eNOS .....	95
2.5.2. Determinación del grado de fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC <sub>20</sub> ) y de la subunidad reguladora de la fosfatasa (MYPT) .....	97
<b>2.6. Inmunohistoquímica .....</b>	<b>98</b>
<b>2.7. Análisis morfométrico.....</b>	<b>99</b>
<b>2.8. Cálculos y análisis de los resultados.....</b>	<b>100</b>

#### **IV. RESULTADOS .....103**

##### **1. MECANISMOS DE ENTRADA DE Ca<sup>2+</sup> Y DE SENSIBILIZACIÓN AL Ca<sup>2+</sup> IMPLICADOS EN LA VASOCONSTRICCIÓN $\alpha_1$ -ADRENÉRGICA DE LAS ARTERIAS PENEANAS ..... 105**

###### **1.1. Contribución de la entrada de Ca<sup>2+</sup> y de los depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> a la vasoconstricción $\alpha_1$ -adrenérgica ..... 105**

1.1.1. Efecto de la despolarización y de la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico sobre la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la tensión ..... 105

1.1.2. Papel del Ca<sup>2+</sup> extracelular en los incrementos de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y de la contracción inducidos por fenilefrina..... 106

1.1.3. Efecto del vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> con CPA sobre la tensión ..... 108

1.1.4. Efecto del vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> con CPA sobre la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>..... 110

###### **1.2. Papel de RhoK en la regulación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> activada por fenilefrina ..... 113**

1.2.1. Efecto de la inhibición de RhoK sobre las contracciones inducidas por la EET y por la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico ..... 113

1.2.2. Efecto de la inhibición de RhoK sobre los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la tensión inducidos por la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico ..... 114

1.2.3. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la entrada de Ca<sup>2+</sup> activada por fenilefrina no mediada por canales de tipo L..... 116

1.2.4. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la entrada de Ba<sup>2+</sup> activada por fenilefrina ..... 118

1.2.5. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la entrada de capacitativa de $\text{Ca}^{2+}$ .....	118
1.2.6. Identificación de la expresión del canal TRP6 mediante Western blotting.....	120
<b>1.3. Mecanismos de sensibilización al <math>\text{Ca}^{2+}</math> acoplados a la activación del receptor <math>\alpha_1</math>-adrenérgico.....</b>	<b>121</b>
1.3.1. Sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ del aparato contráctil en arterias permeabilizadas con $\alpha$ -toxina .....	121
1.3.2. Efecto de la inhibición de la proteína quinasa C (PKC), las tirosina quinasas (TKs) y la RhoK en la sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ inducida por activación del receptor $\alpha_1$ -adrenérgico.....	123
<b>1.4. Papel de la RhoK en los mecanismos de sensibilización al <math>\text{Ca}^{2+}</math> .....</b>	<b>124</b>
1.4.1. Efecto de la inhibición de RhoK sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la tensión inducidos por la despolarización con KPSS .....	124
1.4.2. Efecto de la inhibición de RhoK en arterias permeabilizadas con $\alpha$ -toxina .....	125
<b>2. MECANISMOS DE ENTRADA DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> Y DE SENSIBILIZACIÓN AL <math>\text{Ca}^{2+}</math> ACOPLADOS A LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR TP EN ARTERIAS PENEANAS .....</b>	<b>127</b>
<b>2.1. Caracterización de los mecanismos de entrada de <math>\text{Ca}^{2+}</math> desde el medio extracelular.....</b>	<b>127</b>
2.1.1. Efecto de la activación del receptor TP sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la tensión .....	127
2.1.2. Papel del $\text{Ca}^{2+}$ extracelular en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de la contracción inducidos por U46619.....	128
<b>2.2. Papel de RhoK en los mecanismos de sensibilización al <math>\text{Ca}^{2+}</math> activados por U46619 .....</b>	<b>130</b>
2.2.1. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la contracción inducida por U46619 .....	130
2.2.2. Efecto de la inhibición de RhoK y PKC sobre la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina ( $\text{MLC}_{20}$ ) y de la subunidad reguladora de la fosfatasa (MYPT) inducida por U46619 .....	133

<b>3. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DEL <math>\text{Ca}^{2+}</math> EN LA VASCULOPATÍA DIABÉTICA.....</b>	<b>135</b>
<b>3.1. Parámetros metabólicos y hemodinámicos de las ratas Zucker .....</b>	<b>135</b>
<b>3.2. Estructura y análisis morfométrico de las preparaciones arteriales.....</b>	<b>136</b>
<b>3.3. Estudio de la vasoconstricción inducida por EET, KPSS y agonistas .....</b>	<b>138</b>
<b>3.4. Estudio de la vasodilatación dependiente del endotelio .....</b>	<b>140</b>
<b>3.5. Implicación del NO en la reactividad vascular alterada.....</b>	<b>142</b>
3.5.1. <i>Papel del NO en la vasoconstricción inducida por EET y agonistas .....</i>	<i>142</i>
3.5.2. <i>Papel del NO en la vasodilatación inducida por agonistas y por la inhibición de la fosfodiesterasa 5 (PDE-5).....</i>	<i>144</i>
<b>3.6. Determinación de la expresión de la enzima eNOS mediante inmunohistoquímica y Western blotting .....</b>	<b>146</b>
<b>3.7. Papel de la producción de aniones superóxido en la reactividad vascular alterada.....</b>	<b>146</b>
<b>4. PAPEL DEL <math>\text{Ca}^{2+}</math> EN LA RESPUESTA CONTRÁCTIL DE LAS ARTERIAS PENEANAS DURANTE EL SÍNDROME METABÓLICO.....</b>	<b>149</b>
<b>4.1. Cambios en la <math>[\text{Ca}^{2+}]_i</math> y la tensión inducidos por la fenilefrina en las arterias peneanas de LZR y OZR .....</b>	<b>149</b>
<b>4.2. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la EET y sobre la elevación en la <math>[\text{Ca}^{2+}]_i</math> y la tensión inducidas por la fenilefrina.....</b>	<b>151</b>
<b>4.3. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la <math>[\text{Ca}^{2+}]_i</math> y la tensión inducidas por KPSS .....</b>	<b>156</b>
<b>4.4. Determinación de la expresión de la enzima RhoK.....</b>	<b>157</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>159</b>
<b>1. PAPEL DEL <math>\text{Ca}^{2+}</math> EN LA VASOCONSTRICCIÓN <math>\alpha_1</math>-ADRENÉRGICA DE LAS ARTERIAS PENEANAS .....</b>	<b>161</b>
<b>1.1. Contribución de la entrada de <math>\text{Ca}^{2+}</math> a la vasoconstricción arterial <math>\alpha_1</math>-adrenérgica .....</b>	<b>162</b>
<b>1.2. Papel de RhoK en la regulación de la entrada de <math>\text{Ca}^{2+}</math> acoplada a la activación del receptor <math>\alpha_1</math>-adrenérgico .....</b>	<b>167</b>

1.3. Mecanismos de sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ activados por el receptor $\alpha_1$ -adrenérgico.....	170
1.4. Implicación de RhoK en los mecanismos de sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ activados por el receptor $\alpha_1$ -adrenérgico.....	171
2. PAPEL DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA VASOCONSTRICCIÓN ASOCIADA A LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR TP EN ARTERIAS PENEANAS .....	173
2.1. Contribución de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ a la vasoconstricción arterial mediada por el receptor TP .....	173
2.2. Mecanismos de sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ activados por el receptor TP .....	176
3. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA VASCULOPATÍA DIABÉTICA PENEANA.....	178
3.1. Cambios estructurales en arterias peneanas de animales con Síndrome Metabólico .....	179
3.2. Vasoconstricción alterada en arterias de animales con Síndrome Metabólico.....	182
3.3. Disfunción endotelial en arterias de animales con Síndrome Metabólico.....	182
3.3.1. Papel del NO en las respuestas relajantes dependientes del endotelio ...	184
3.3.2. Influencia del estrés oxidativo sobre la función endotelial.....	186
4. ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LAS ARTERIAS PENEANAS DURANTE EL SÍNDROME METABÓLICO .....	188
VI. CONCLUSIONES.....	197
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	201
VIII. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	237

## **I. INTRODUCCIÓN**



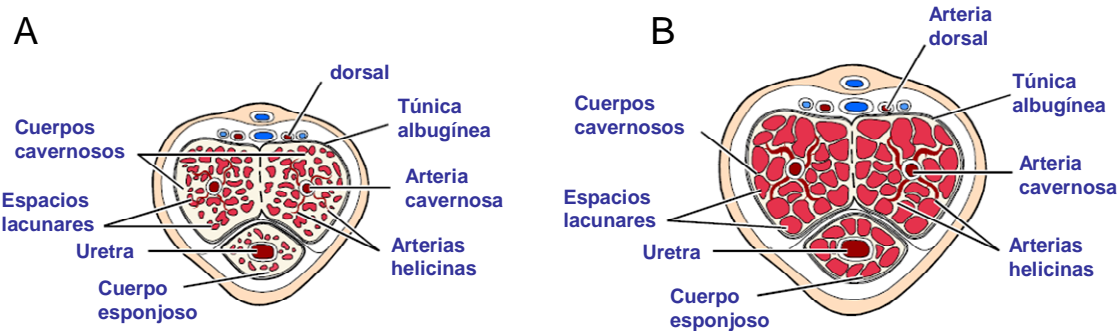
## **1. FISIOLÓGÍA DE LA ERECCIÓN**

La erección es la consecuencia de modificaciones en la irrigación de los cuerpos cavernosos del pene bajo el control de los nervios vasomotores, aumentando el flujo arterial y reduciendo la evacuación venosa, lo cual tiene como resultado la distensión de los cuerpos cavernosos. En este proceso intervienen mecanismos complejos que requieren la integridad anatómica, tanto vascular como nerviosa, así como también la acción coordinada de diversos neurotransmisores y mediadores paracrinos (Andersson y Wagner, 1995; Andersson, 2001; Simonsen et al., 2002; Prieto, 2008).

El pene es el órgano terminal del aparato urinario y del sistema de vías espermáticas del aparato genital masculino. Se compone principalmente de dos masas dorsales de tejido eréctil, los cuerpos cavernosos y una masa ventral de tejido, el cuerpo esponjoso en el cual se incluye la uretra. Una densa capa fibroelástica, la túnica albugínea (de 2-3 mm en estado flácido) une a las tres masas y forma una cápsula que las rodea; ésta, consta de varias subcapas compuestas de fibras de colágeno, aunque también se pueden encontrar fibras elásticas que están dispuestas de modo diferencial, pues mientras en la capa más interna adoptan una disposición circular, en la más externa es longitudinal. La túnica albugínea del cuerpo esponjoso es mucho más fina y contiene más fibras elásticas (Goldstein y Padma-Nathan, 1990; Hsu et al., 1992; Andersson y Wagner, 1995) (Figura 1). El tejido cavernoso está compuesto por una red de espacios interconectados, tapizados por endotelio vascular y separados por trabéculas, denominados sinusoides cavernosos. Está constituido por haces de músculo liso inmersos en un soporte de colágeno, elastina y fibroblastos (Goldstein y Padma-Nathan, 1990). Los dos cuerpos cavernosos y el cuerpo esponjoso constituyen el tejido eréctil del pene que recibe sangre arterial de las arterias pudendas internas. De éstas derivan las arterias dorsales del pene, que se encuentran cerca de la superficie dorsal del pene en la túnica albugínea y por otra parte, las arterias cavernosas que discurren en sentido longitudinal a través de cada cuerpo cavernoso y cuyas ramas son las arterias helicinales. Dos arterias bulbouretrales discurren longitudinalmente a través del cuerpo esponjoso en dirección ventral con respecto a la uretra. Estas arterias terminan



en pequeños capilares que se abren en forma directa en los espacios cavernosos. Aumentan en tamaño y rigidez al llenarse de sangre los cuerpos cavernosos derivada en su mayoría de las arterias helicinas, que son ramas de segundo o tercer orden de la arteria cavernosa profunda; El retorno venoso se realiza por la vena dorsal superficial y por la vena dorsal profunda. Las venas emisarias que recorren la túnica albugínea permiten el drenaje sanguíneo hacia la vena dorsal profunda a través de las venas circunflejas (Andersson y Wagner, 1995).



**Figura 1. Irrigación del pene.** Corte transversal del pene cuando se encuentra en estado flácido (A) y durante la erección (B).

La erección tiene lugar cuando el flujo sanguíneo que entra en el pene supera al flujo de salida. Así, tras la estimulación sexual, la activación de los nervios parasimpáticos provoca la liberación de neurotransmisores como el óxido nítrico (NO), la acetilcolina o el péptido intestinal vasoactivo (VIP) desde las terminaciones nerviosas, así como factores vasoactivos relajantes desde las células endoteliales causando la relajación del músculo liso en el sistema arterial y permitiendo así el incremento del flujo sanguíneo a los sinusoides cavernosos (Andersson y Wagner, 1995; Simonsen et al., 1995, 1997, 2002; Prieto et al., 1998). Al mismo tiempo, la relajación del músculo liso trabecular, incrementa la complianza de los sinusoides, acentuando la expansión y llenado de los mismos. Esta distensión produce una compresión mecánica de las venas emisarias activando el *fenómeno de venooclusión* en el que un aumento del volumen peneano por la entrada de sangre, provoca un aumento en la

resistencia al drenaje de los cuerpos cavernosos junto con una elongación en las vénulas consiguiendo reducir su diámetro, de manera que el paso de sangre a través de unos canales venosos más largos y estrechos provoca un aumento en la resistencia al paso de fluido (Andersson y Wagner, 1995).

El pene está innervado por fibras nerviosas autónomas y somáticas. La estimulación de los nervios sacros parasimpáticos conduce a la erección, mientras que la actividad de los nervios simpáticos lumbares origina la vasoconstricción peneana y es responsable de la detumescencia y del mantenimiento del estado de flacidez (Andersson y Wagner, 1995). Mientras que los nervios adrenérgicos son los principales mediadores de la contracción arterial y trabecular en la detumescencia, los procesos de relajación que conducen a la erección están bajo el control de nervios colinérgicos y no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC) que liberan NO y otros mediadores de naturaleza peptídica como el VIP (Andersson y Wagner, 1995; Simonsen et al., 2002). Además de la participación coordinada del sistema nervioso periférico, existe un patrón central en el control nervioso de la erección, en el que están involucrados al menos dos factores: factores psicógenos y reflexógenos (DeGroat y Booth, 1993).

Los procesos de erección y detumescencia han sido descritos y divididos en siete fases por diferentes investigadores (Aboseif y Lue, 1988; Batra y Lue, 1991; Andersson y Wagner, 1995):

- Fase 0 (*fase de flacidez*): Durante la fase de flacidez, el pene está bajo el dominio del sistema nervioso simpático; las arterias peneanas y cuerpos cavernosos se encuentran contraídos. El flujo sanguíneo a través de las arterias es mínimo y con una finalidad nutricional; además, existe un flujo de salida libre desde las vénulas subalbugíneas a las venas emisarias.

- Fase 1 (*fase de latencia o de llenado*): Esta fase tiene lugar cuando tras la estimulación sexual existe un predominio local del sistema nervioso parasimpático. En esta fase existe un incremento en el flujo sanguíneo. La resistencia periférica disminuye como consecuencia de la dilatación de las arterias cavernosas y helicinas.

○ Fase 2 (*fase de tumescencia*): Es una fase que está caracterizada principalmente por cambios hemodinámicos. Existe un incremento rápido en el flujo de entrada desde el estado de flacidez y la presión intracavernosa se eleva rápidamente. Como consecuencia de la relajación del músculo liso trabecular, la complianza de los cuerpos cavernosos aumenta de forma importante causando engrosamiento y erección. Al final de esta fase el flujo arterial disminuye.

○ Fase 3 (*fase de erección completa*): El músculo liso trabecular relajado se expande y la presión arterial sistémica que se transmite a través de las arterias dilatadas hace que las paredes trabeculares se expandan contra la túnica albugínea. En esta fase tienen un papel fundamental los sinusoides cavernosos. Sin embargo, se considera que el “*mecanismo venooclusivo*” fundamental recae sobre las vénulas subalbugíneas, cuyo cambio de conformación inducido por el aumento del volumen peneano al pasar del estado de flacidez al de erección, causa un aumento en la resistencia al drenaje de los cuerpos cavernosos. Además, al aumentar el pene de volumen, las venas se elongan y disminuyen su diámetro, lo que provoca un aumento en la resistencia al paso de fluido. La activación del mecanismo venooclusivo origina un aumento en la resistencia a la evacuación de la sangre intracavernosa del orden de 100 veces mayor que en el estado de flacidez, impidiendo su capacidad para el drenaje sanguíneo, de lo que resulta la erección (Sáenz de Tejada y Allona, 1997).

○ Fase 4 (*fase de erección o esquelética*): La contracción voluntaria, o la refleja que sigue a la estimulación del glándulo o de la piel (“*reflejo bulbocavernoso*”), de los músculos isquio y bulbocavernosos aumentan la presión intracavernosa y disminuyen el volumen de los cuerpos cavernosos. Este aumento transitorio de la presión intracavernosa contribuye a aumentar la rigidez peneana durante el estado de erección. La detumescencia se produce con la contracción del músculo liso peneano. La contracción de las arterias peneanas hace que disminuya el flujo sanguíneo a los cuerpos cavernosos. La contracción del músculo trabecular origina que los sinusoides cavernosos se colapsen causando descompresión de las vénulas de drenaje de los cuerpos

cavernosos. Esta sucesión de acontecimientos facilitan la vuelta al estado de flacidez.

- Fase 5 (*fase de transición*): El incremento en la actividad del sistema nervioso simpático conduce a un incremento en el tono de las arterias helicinas y la contracción del músculo liso trabecular. El flujo arterial disminuye y el mecanismo venooclusivo permanece activo.

- Fase 6 (*fase de detumescencia lenta*): Existe un moderado descenso de la presión intracavernosa indicando una reapertura de los canales venosos de salida, y un descenso del flujo arterial.

- Fase 7 (*fase de detumescencia rápida*): La presión intracavernosa disminuye rápidamente, el mecanismo venooclusivo se inactiva, el flujo arterial disminuye a los niveles de la preestimulación y el pene regresa al estado de flacidez.

### **1.1. Regulación fisiológica del tono del tejido eréctil: vasodilatadores y vasoconstrictores**

El tono del músculo liso peneano está determinado por el balance entre factores contráctiles y relajantes. En su regulación intervienen diversos neurotransmisores, hormonas, autacoides y factores endoteliales siendo todos ellos los que en última instancia determinan a través de sus mecanismos de señalización intracelular la modulación del tono vascular (Andersson y Wagner, 1995).

#### **1.1.1. Factores que intervienen en la vasorelajación-erección**

La relajación del músculo liso peneano depende de mecanismos de diversa naturaleza: nerviosos, endocrinos, paracrinós (sustancias relajantes liberadas desde el endotelio vecino) y autocrinos (factores generados en el propio músculo liso), mostrando todos ellos un papel importante en la erección peneana.

*a. Óxido nítrico (NO)*

El NO tiene importantes funciones a nivel fisiológico como son la regulación del tono vascular, la neurotransmisión, la citotoxicidad celular ante agentes patógenos o células tumorales, y la erección penénea (Burnett, 1995; Ignarro, 1999; Bogdan, 2001). La síntesis de NO y la vía del NO/GMP<sub>c</sub> están implicados en el mantenimiento y control fisiológico de la erección penénea (Burnett, 2004). La enzima que cataliza esta reacción en células y neuronas es la sintasa del óxido nítrico (NOS). Esta enzima oxida la L-arginina mediante un proceso que consume nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) reducido y oxígeno para dar lugar a NO y L-citrulina. Esta reacción requiere además de NADPH de la colaboración de otros cofactores como la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), calmodulina (CaM) y flavina dinucleótido (FAD) (Moncada, 1997; Fleming y Busse, 2003). A diferencia de otros neurotransmisores, el NO se sintetiza en función de la demanda y no se almacena en vesículas sinápticas ni es liberado por exocitosis, sino que difunde a través de las terminaciones nerviosas.

Existen dos formas constitutivas de la enzima NOS y una forma inducible. Las formas constitutivas se localizan a nivel de los nervios (nNOS) y en el endotelio (eNOS), y su activación requiere el incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) y la unión de dos moléculas de CaM, así como de cofactores que permiten llevar a cabo dos reacciones de monooxigenación secuencial que conllevan la síntesis de NO (Cartledge et al, 2001). La eNOS y la nNOS son las isoformas de NOS principales implicadas en la inducción de la erección penénea (Burnett et al., 1992), mientras la isoforma inducible (iNOS) es independiente de la elevación en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y calmodulina y requiere de nueva síntesis de proteínas. La isoforma eNOS se encuentra unida a la membrana, mientras la localización de nNOS se limita al citosol y neuronas centrales y periféricas. Estudios funcionales e inmunohistoquímicos han localizado la enzima eNOS en el endotelio vascular y del tejido trabecular del pene y la nNOS en terminaciones nerviosas procedentes de nervios penéneos (plexo pélvico, nervio dorsal y nervio cavernoso) (Podlasek et al., 2001; Stanarius et al., 2001; Azadzoi et al., 2004).

Las concentraciones de NO presentan fluctuaciones continuas hasta alcanzar niveles bajos en el sistema cardiovascular y se encuentran fundamentalmente controladas por la eNOS. La actividad de las enzimas constitutivas eNOS y nNOS se encuentra regulada a nivel post-translacional, mientras iNOS se expresa en respuesta a estímulos concretos (citoquinas, inflamación) o factores de transcripción (factor nuclear kappa B; NF- $\kappa$ B). La localización subcelular de eNOS en microdominios de la membrana plasmática, su interacción con caveolina-1, y su estado de fosforilación en residuos específicos de serina y treonina poseen un papel fundamental en la regulación post-translacional de su actividad enzimática (Fleming y Busse, 1999). El NO producido tanto por 1) la eNOS en las células endoteliales que tapizan los cuerpos cavernosos y arterias peneanas en respuesta a las fuerzas de cizallamiento o “*shear stress*” y a agonistas como la Acetilcolina liberada desde las terminaciones nerviosas colinérgicas y 2) la actividad de la enzima nNOS en neuronas NANC está implicado en los eventos de señalización intracelular como la neurotransmisión y la regulación del tono vascular peneano.

La relajación residual que existe tras la estimulación eléctrica de los nervios bajo condiciones de bloqueo de la NOS podría estar mediada por diversos neurotransmisores como son el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), el PACAP, el adenosín 5'-trifosfato (ATP) o el monóxido de carbono (CO). Algunos de estos agonistas producen una acumulación de AMP<sub>c</sub> a nivel intracelular, efecto que podría ser inhibido por los receptores  $\alpha_2$  postsinápticos (Limbird, 1988), los cuales están presentes tanto en el CC (Gupta et al., 1998) como en las arterias peneanas (Simonsen et al., 2002).

#### *a.1. Endotelio y NO endotelial*

Desde que en 1980 Furchgott y Zawadzki situaron la función del endotelio vascular más allá de la de simple barrera pasiva, se ha demostrado que esta estructura interviene en la regulación del tono vascular mediante la liberación de una gran variedad de factores tanto contráctiles como relajantes y además tiene un papel importante en otros procesos como son la regulación de la

inflamación, la agregación plaquetaria o la proliferación de las células musculares lisas a nivel vascular (Behrendt y Ganz, 2002). Una vez sintetizado el NO y liberado de las terminaciones nerviosas nitrérgicas por acción de la nNOS y de las células endoteliales en arterias y cuerpos cavernosos vía eNOS, éste difunde a través de las células musculares lisas donde activa a la enzima guanilato ciclasa soluble (GC), constituida por dos subunidades diferentes y un grupo prostético, produciéndose un cambio conformacional y aumentando la actividad enzimática de forma que promueve la conversión del guanosín-5'-trifosfato (GTP) a  $\text{GMP}_c$ . La GC comprende tanto isoformas solubles como isoformas ancladas en la membrana, ambas expresadas en casi todos los tipos celulares. En el pene, la GC soluble constituye una de las dianas fisiológicas más importantes para el NO (Andersson, 2001; Mizusawa et al., 2001).

La elevación de la concentración del  $\text{GMP}_c$  que a su vez activa la enzima proteína quinasa dependiente del  $\text{GMP}_c$  I (cGKI o PKG) induce una serie de eventos a nivel intracelular que permiten la relajación del músculo liso arterial y trabecular y el llenado de los sinusoides cavernosos desencadenando así el proceso de erección mediante la reducción de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) a través de diferentes mecanismos:

- Activación de canales iónicos o bombas de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  que reducen la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por secuestro y/o extrusión de este ión.
- Apertura de canales de potasio que origina hiperpolarización de las células musculares lisas. En las arterias de resistencia peneanas, el NO nervioso y endotelial estimula canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) a través del  $\text{GMP}_c$  (Simonsen et al., 1995; Prieto et al., 1998).
- Activación de la fosfatasa de las cadenas ligera de miosina (MLCP) que desfosforilan las cadenas de miosina provocando el cese de la contracción (Mills et al., 2002).

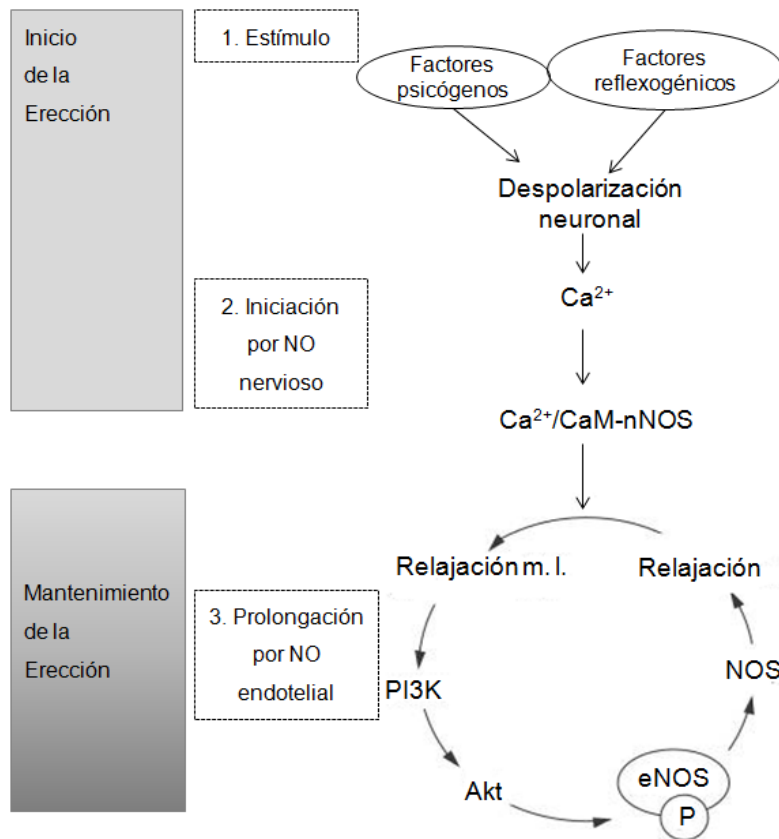
El cese de las acciones del  $\text{GMP}_c$  tiene lugar mediante la enzima PDE-5 la cual revierte el efecto desencadenado por el NO a través de una metabolización rápida del  $\text{GMP}_c$  a guanosín-5'-monofosfato (GMP). Las PDEs

catalizan la hidrólisis de otros segundos mensajeros como el adenosín monofato cíclico ( $\text{AMP}_c$ ) y pertenecen a una superfamilia que está subdividida en 11 familias. Más de 40 isoformas han sido caracterizadas, todas ellas difieren en su estructura primaria, especificidad por el sustrato ( $\text{AMP}_c$  y/o  $\text{GMP}_c$ ), propiedades cinéticas, mecanismos de regulación y distribución tisular (Fawcett et al., 2000; Hetman et al., 2000). El efecto relajante de los inhibidores de PDE-5 como es el sildenafil ha sido ampliamente estudiado. Así, se ha demostrado en las arterias peneanas equinas que parte de su efecto relajante es debido además de la acumulación de  $\text{GMP}_c$  a partir de la liberación basal de NO derivado del endotelio (Prieto et al., 2006). Así mismo, también se ha caracterizado el mecanismo de acción de otros inhibidores de PDE-5 como el vardenafilo, cuya acción vasodilatadora es parcialmente dependiente del endotelio y de la vía del NO/ $\text{GMP}_c$ , así como de la activación de canales  $\text{K}_{Ca}$  y de canales de  $\text{K}^+$  sensibles a ATP ( $\text{K}_{ATP}$ ) (Sánchez et al., 2008). Recientemente también se ha implicado al sildenafil en la reversión de la fibrosis del cuerpo cavernoso que precede a la alteración del fenómeno venooclusivo en la disfunción eréctil asociada a la edad (Ferrini et al., 2007) o la inducida por la lesión del nervio cavernoso, en un proceso independiente de la inducción de la iNOS (Kovanecz et al., 2008). Por su papel en la regulación del tono vascular y la gran variabilidad en cuanto a distribución de sus isoenzimas en los tejidos, las PDEs representan una de las dianas más importantes para la terapia farmacológica de la disfunción eréctil. Los inhibidores orales de la PDE-5 (como el sildenafil, tadalafil y vardenafilo) se utilizan en la actualidad con éxito en el tratamiento de la disfunción eréctil (Broderick, 2003; Mulhall y Montorsi, 2006).

La importancia de la vía del  $\text{GMP}_c$ /PKG en la erección penena ha sido establecida en ratones en los que se ha eliminado el gen que codifica para dicha proteína identificando así a esta enzima como la diana fisiológica del  $\text{GMP}_c$  en el tejido eréctil y demostrando que el  $\text{AMP}_c$  resulta insuficiente para compensar el déficit en la vía  $\text{GMP}_c$ /PKG *in vivo* en dichos animales. Todo ello está asociado con una reducción significativa de su capacidad reproductora (Hedlund et al., 2000).



El NO de origen nervioso es un mediador importante de la relajación del músculo liso del pene dando lugar al llenado de los sinusoides y desencadenando el proceso de erección. Aunque se ha demostrado que la erección peneana inducida por la estimulación eléctrica del nervio cavernoso queda abolida por los inhibidores de NOS (Hellstrom et al., 1994), ésta sin embargo está preservada en ratones “*knock out*” para eNOS (eNOS<sup>-/-</sup>) (Kriegsfeld et al., 1999). Hurt y col. (2002) demostraron que tanto la estimulación del nervio cavernoso como la relajación inducida por algunos agonistas estaba mediada por la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y por la activación de la serina/treonina proteína cinasa B (PKB o Akt). Dicha ruta interviene en la fosforilación directa de la enzima eNOS independientemente de la elevación en la  $[Ca^{2+}]_i$  y su activación incrementa la producción endotelial de NO (Fulton et al., 1999). Se ha demostrado que las enzimas eNOS y la nNOS intervienen en la iniciación y en el mantenimiento de la erección máxima, respectivamente. Así, la consecución de la tumescencia completa sería el resultado de una amplificación de las acciones del NO derivado de la eNOS, tras la relajación previa iniciada por el NO de origen nervioso (nNOS) (Burnett, 1998). Así, las señales de origen nervioso (reflexogénicas) inician el proceso de erección mediante la activación de la nNOS como consecuencia de la entrada de  $Ca^{2+}$  subsiguiente a la despolarización neuronal y su unión a la CaM (Bredt y Snyder, 1990). Esta activación de la nNOS dependiente de  $Ca^{2+}$ /CaM es reversible y breve en el tiempo, pero la vasorelajación inducida por el NO nervioso provoca el incremento del flujo sanguíneo y la consecuente expansión de los vasos sanguíneos penes y llenado de los sinusoides cavernosos. El *shear stress* sobre el endotelio vascular y de los sinusoides cavernosos produce la activación de la vía PI3K/Akt y fosforilación de eNOS causando una liberación de NO y una relajación sostenida del músculo liso responsable del mantenimiento de la erección peneana (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema de la implicación de las isoformas nNOS y eNOS en el inicio y mantenimiento de la erección penena. (Adaptado de Hurt et al., 2002).

### a.2. Regulación de la actividad de eNOS

La actividad de la isoenzima eNOS está sometida a un control transcripcional y post-translacional en la que podemos diferenciar reguladores positivos y negativos de la actividad de eNOS.

#### Reguladores positivos de la actividad de eNOS:

##### Complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$

Los agentes que aumentan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ya sea por permitir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior o por estimular la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares, pueden activar a las enzimas constitutivas. En las células endoteliales diversos agonistas como la bradicinina, la histamina, la serotonina y la acetilcolina, aumentan el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y por tanto la síntesis de NO. El  $\text{Ca}^{2+}$  forma un complejo con la

CaM, que se une a la eNOS promoviendo un flujo de electrones dependiente de NADPH desde un monómero a otro (Busse y Mülsch, 1990).

*Sitios de fosforilación de eNOS que incrementan su actividad*

La eNOS puede ser fosforilada por diversos estímulos en ausencia de un incremento sostenido del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. El principal fenómeno fisiológico que promueve dicha activación de eNOS son la vasodilatación inducida por flujo, las hormonas y factores de crecimiento, que incrementan la actividad de la ruta PI3K/Akt y con ello la producción de NO tras la fosforilación de la NOS en el residuo Ser1177 (de la secuencia humana, equivalente a Ser1179 bovina) que posee un papel indispensable en la erección (Hurt et al., 2002).

El papel de la vía PI3K/Akt ha sido estudiado en el tejido eréctil. Tanto en ratas como en ratones, la erección inducida por agonistas y por estimulación nerviosa produce un incremento rápido en la fosforilación de Akt y de eNOS en el residuo Ser1177 en el pene, el cual se mantiene en el tiempo aún cuando ha cesado el estímulo (Hurt et al., 2002). Dependiendo del estímulo y del lecho vascular, el residuo Ser1177 puede ser fosforilado por otras quinasas como son Akt, PKA, PKG, proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM y PKC (Sessa, 2004).

Además del residuo Ser 1177, eNOS puede ser fosforilada en otros sitios, como Ser114, Thr495, Ser615 y Ser633 (correspondientes a las secuencias humanas, equivalentes a Ser116, Thr497, Ser617 y Ser635 de la eNOS bovina), los cuales incrementan o disminuyen la actividad enzimática bien directamente o por modulación de otros sitios reguladores en la enzima. Los residuos de Ser633 y Ser615 incrementan la actividad enzimática cuando se encuentran fosforilados (Michell et al., 2002). La fosforilación de eNOS en el residuo de Tyr83 (Tyr81 humana) por quinasas de la familia Src también contribuye a incrementar la actividad de eNOS afectando al proceso de activación mediado por  $\text{Ca}^{2+}$ , modificando las interacciones proteína-proteína o alterando la localización subcelular de la enzima (Fulton et al., 2005; Fulton et al., 2008).

### *Proteínas circulantes que favorecen la actividad de eNOS*

La proteína de choque térmico 90 (Hsp90) es una de las proteínas citosólicas más abundantes en las células eucariotas. Puede interaccionar con eNOS e incrementar su actividad. La interacción de Hsp90 con eNOS está mediada por agonistas, *shear stress*, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) y los estrógenos. La unión con la enzima favorece la fosforilación del complejo Hsp90-eNOS por la Akt y la interrupción de la unión de eNOS con la caveolina-1 (García-Cardena et al., 1998). La interacción entre el complejo eNOS y Hsp90 está regulado por la fosforilación de eNOS en los residuos de Ser615 y Ser114 (Bauer et al., 2003).

### **Reguladores negativos de la actividad de eNOS:**

#### *Sitios de fosforilación de eNOS que disminuyen su actividad*

La fosforilación de eNOS en el residuo Thr495 por la PKC está asociado con un descenso en la actividad enzimática de eNOS debido a un incremento de la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM por la enzima. La desfosforilación recíproca del residuo Thr495 y la fosforilación en Ser1177 parecen ser esenciales para la actividad de eNOS (Michell et al., 2001; Fleming et al., 2001). La fosforilación en el residuo Ser116 también parece reducir la actividad de eNOS (Boo et al., 2002).

Recientemente se ha demostrado que la fosforilación de estos residuos en la eNOS juega un papel esencial en la fisiología de la erección. Así, en la rata, la estimulación del nervio cavernoso incrementa la fosforilación del residuo Thr495 (Musicki et al., 2005b), sugiriendo un papel para eNOS de autoregulación de su propia actividad que evitaría una excesiva prolongación de la erección dependiente de eNOS. Por otro lado, la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) también regula negativamente la actividad de eNOS en el pene. Sommer y col. (2002) demostraron que ERK1/2 se sobreexpresa en el músculo liso de varones con disfunción eréctil. El mecanismo por el que ERK1/2 inhibe la actividad de eNOS en el pene es desconocido.

### *Interacciones proteína-proteína—Caveolas-caveolina-1*

La adecuada localización subcelular de eNOS tiene un papel crítico en la estimulación de la enzima y producción de NO. La eNOS en su estado funcional está unida a la membrana y está regulada por algunas modificaciones translacionales como son la N-miristoilación y palmitoilación (Alderton et al, 2001). La proteína presente en las caveolas, la caveolina-1 puede interaccionar directamente con eNOS e inhibir su actividad al ocupar el sitio de unión a la CaM (Feron et al, 1996; García-Cardena et al, 1997). Diversos estímulos como el *shear stress* inducen un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM desplaza a eNOS de su unión con la caveolina-1 permitiendo la redistribución de eNOS a lo largo de la membrana plasmática y cesando así su inhibición tónica (Michel et al, 1997; Feron et al, 1998).

Existe poca información acerca de la interacción de eNOS con moduladores negativos a nivel del pene y de su importancia fisiológica en la erección, si bien se ha demostrado la expresión de caveolina-1 en el pene de rata y porcino (Bakircioglu et al, 2000, 2001; Linder et al, 2006; Musicki et al, 2008). La estimulación eléctrica del nervio cavernoso disminuye los niveles de caveolina-1 unida a eNOS. Además, la interacción entre eNOS y la caveolina-1 mediante la inyección intracavernosa del péptido AP-Cav, un análogo de la caveolina que se une a eNOS (Bucci et al., 2000), disminuye la respuesta eréctil, sugiriendo así que la interacción entre eNOS y caveolina-1 disminuye la activación de eNOS en el pene y por lo tanto se opone a la erección mediada por NO.

### *b. Acetilcolina (ACh)*

La acetilcolina es liberada durante la estimulación de los nervios parasimpáticos sacros durante el proceso de erección. Los nervios colinérgicos presentes en el cuerpo cavernoso y las arterias tienen un papel modulador a nivel local de los sistemas neuroefectores. La acetilcolina, a través de receptores muscarínicos, potencia la liberación de NO de fibras nitrérgicas presentes en el tejido peneano humano. La acetilcolina liberada de los nervios se une a receptores muscarínicos localizados en los nervios adrenérgicos,

músculo liso y en el endotelio del cuerpo cavernoso y de las arterias (Prieto et al., 1998; Andersson, 2001). En el cuerpo cavernoso se expresan cuatro subtipos de receptores muscarínicos ( $M_1$ - $M_4$ ). Los subtipos  $M_2$  y  $M_4$  están acoplados a proteínas G inhibitorias ( $G_i$ ), por lo que mediarían indirectamente efectos contráctiles de la acetilcolina en el tejido trabecular (Traish et al., 1995). A nivel de las células endoteliales, la acetilcolina estimula receptores  $M_3$  ( $G_q$ /PLC). Así, la unión de la acetilcolina a su receptor en la membrana de las células endoteliales promueve la formación de inositol trifosfato ( $InsP_3$ ), el cual libera  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico. Esta elevación conlleva la formación del complejo  $Ca^{2+}$ -CaM que estimula a la enzima eNOS y por tanto la formación de NO (Traish et al., 1990; Moreland et al., 2001; Berridge, 2008). La elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  originada en las células endoteliales conduce también a la síntesis y liberación de otros factores endoteliales relajantes como el no identificado todavía factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y prostanoïdes como la prostaciclina ( $PGI_2$ ) (Prieto et al., 1998; Andersson, 2001; Simonsen et al., 2002; Berridge, 2008).

La relajación inducida por la acetilcolina en el cuerpo cavernoso también es indirecta y se produce bien por inhibición de la liberación de neurotransmisores contráctiles como la noradrenalina, o bien al inducir la liberación de factores relajantes como el NO. Por tanto, la actividad parasimpática produce erección por inhibición de la liberación de noradrenalina a través de la estimulación de receptores muscarínicos  $M_2$  en terminaciones nerviosas adrenérgicas y/o por liberación de NO, EDHF o péptidos vasodilatadores a nivel endotelial (Traish et al., 1990; Prieto et al., 1998, Andersson, 2001; Moreland et al., 2001).

### *c. Péptido intestinal vasoactivo (VIP)*

Tanto el tejido eréctil humano como el de diversas especies animales poseen nervios que contienen VIP (Dail, 1993). La mayor parte de estas terminaciones nerviosas poseen inmunoreactividad positiva para la enzima NOS y además, la colocación de NOS y VIP en los nervios que inervan el tejido eréctil peneano ha sido demostrada por diferentes investigadores. Parece

que la mayor parte de las neuronas que contienen NO y VIP son colinérgicas, ya que poseen un transportador de acetilcolina (VACHT), el cual es un marcador específico de neuronas colinérgicas (Hedlund et al., 1999; Andersson, 2001).

El VIP actúa a través de receptores de los tipos 1 y 2 acoplados a proteínas G y ligados a la estimulación de la vía de la adenilato ciclasa (AC) (Fahrenkrug, 1993). La importancia de los subtipos de receptores en el tejido eréctil no ha sido clarificada. El efecto estimulador del VIP sobre la AC hace que se incrementen los niveles citosólicos de AMP<sub>c</sub>, el cual activa a una serie de quinasas de proteínas dependientes de AMP<sub>c</sub>. El VIP produce relajación tanto del músculo liso vascular como trabecular del pene. El VIP posee un efecto inhibitorio y se ha mostrado que *in vitro* produce relajación del músculo liso arterial y trabecular humano (Andersson y Wagner, 1995; Okamura et al., 1998). Suh y col. (1995) investigaron en la rata el efecto de la administración intracavernosa de VIP solo y VIP combinado con acetilcolina encontraron que el VIP y la acetilcolina, individualmente o en combinación, no producen erección completa y concluyeron que ninguno de ellos actuaba como neurotransmisor principal en el proceso de relajación. Kim y col. (1995) concluyeron tras la realización de estudios en cuerpo cavernoso de conejo que el VIP parecía contribuir a la transmisión NANC produciendo relajación mediante un mecanismo dependiente de prostanoïdes y por generación de NO. No está claro si el VIP posee un papel importante como neurotransmisor o como modulador en el tejido eréctil, pero en cualquier caso su papel fisiológico en la erección y por tanto en la disfunción eréctil necesita ser resuelto.

#### *d. Prostaglandinas*

Durante la vasodilatación inducida por flujo a nivel del pene, existe otro mecanismo que contribuye al incremento de la relajación del músculo liso trabecular y arterial que es la activación de la síntesis de PGE mediante un mecanismo dependiente de NO (Ballerman et al., 1998). Los vasodilatadores PGE y PGI<sub>2</sub> son producidos por las células endoteliales a nivel de los vasos sanguíneos. La PGI<sub>2</sub> es el derivado de ácido araquidónico más abundante

generado a nivel del tejido vascular (McNamara et al., 1998). Las dos isoformas de la ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2, pueden convertir el ácido araquidónico en  $\text{PGH}_2$ , y posteriormente la  $\text{PGH}_2$  es convertida en  $\text{PGI}_2$  mediante la enzima  $\text{PGI}_2$  sintasa (PGIS) y en  $\text{PGE}_2$  por la  $\text{PGE}_2$  sintasa (PGES). La  $\text{PGE}$  sintetizada por las células endoteliales en el cuerpo cavernoso en respuesta al *shear stress* se une a receptores específicos (EP) en las células musculares lisas (Traish et al., 1997). La activación de dichos receptores por la  $\text{PGE}$  incrementa los niveles de  $\text{AMP}_c$  mediante la activación de la AC (tipo  $\text{G}_{sa}$ ), causando una reducción en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la relajación del músculo liso peneano (Moreland et al., 2000). Tanto la  $\text{PGE}_2$  como su derivado la  $\text{PGE}_1$  son potentes agentes relajantes en el cuerpo cavernoso humano. Hay cuatro tipos de receptores EP ( $\text{EP}_{1-4}$ ), y todos ellos se expresan en el cuerpo cavernoso (Angulo et al., 2002).  $\text{EP}_2$  y  $\text{EP}_4$  son receptores acoplados a proteínas G y responsables del incremento en la síntesis de  $\text{AMP}_c$  en respuesta a la administración exógena de  $\text{PGE}_1$  en el pene y en células musculares lisas del cuerpo cavernoso en cultivo. La  $\text{PGE}_1$  es un potente vasodilatador de los vasos sanguíneos del pene por activación de una quinasa dependiente de  $\text{AMP}_c$  y de canales de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (Ruiz Rubio et al., 2004a,b) y del cuerpo cavernoso por activación de canales de  $\text{K}_{\text{Ca}}$  (Lee et al., 1999). La  $\text{PGE}_1$  resulta muy eficaz como agente local en el tratamiento de la disfunción eréctil (Leungwattanakij et al., 2001). La  $\text{PGI}_2$  se une a receptores IP que activan a la adenilato ciclasa y como resultado incrementan la  $[\text{AMP}_c]$ , que reduce la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el músculo liso, originando vasorelajación (Angulo et al., 2002).

*e. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)*

A pesar de que su naturaleza no ha sido identificada todavía, el EDHF juega un papel importante en la fisiología de la erección. Se libera a partir de agonistas que actúan a nivel del endotelio o por el *shear stress* produciendo hiperpolarización y relajación del músculo liso por reducción de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel intracelular (Busse et al., 2002). Numerosas evidencias muestran que el EDHF se forma cuando se incrementan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tanto por agonistas como la acetilcolina o bradicinina, como por la



vasodilatación inducida por flujo, promoviendo la síntesis de un metabolito del citocromo P450, el cual es esencial para la relajación mediada por EDHF en algunos lechos vasculares (Fisslthaler et al., 1999; Eskin et al., 2004; Campbell y Falck, 2007). En las arterias helicinas equinas, se observó por primera vez la implicación del EDHF en la relajación dependiente del endotelio, cuando una combinación de bloqueantes de canales de  $K^+$  de intermedia y pequeña conductancia inhibieron la relajación resistente al bloqueo de la NOS y COX (Prieto et al., 1998). Estos resultados fueron confirmados posteriormente en arterias peneanas humanas, donde la relajación dependiente del endotelio fue incrementada por dobesilato cálcico (Angulo et al., 2003). Angulo y col. (2003) demostraron que el EDHF participaba en la relajación de las arterias de resistencia peneanas, siendo ésta resistente a la inhibición de las enzimas NOS y COX, sugiriendo así un papel para el EDHF en la relajación dependiente del endotelio en el lecho vascular peneano. Además, debido a que el inhibidor del citocromo P450 sulfenazol redujo la respuesta eréctil mediada por la estimulación del nervio cavernoso, se sugiere que posiblemente es un metabolito de la enzima citocromo P450 el que media la relajación por EDHF en el pene y contribuye fisiológicamente así a la respuesta eréctil.

Igualmente se ha sugerido que el péptido natriurético auricular, el cual es producido por las células endoteliales tiene una acción paracrina y posee acciones similares al NO (incrementa  $GMP_c$  intracelular) y en paralelo a los efectos mediados por el sistema NO/GC soluble, quizá actúa como el EDHF en las arterias peneanas de resistencia humanas (Kun, et al., 2008).

### 1.1.2. Factores que intervienen en la vasoconstricción-flacidez

#### *a. Prostanoides contráctiles*

Los prostanoides que están implicados en la contracción del tejido eréctil son principalmente la  $PGF_{2\alpha}$  y el  $TXA_2$  (Angulo et al., 2002). La  $PGF_{2\alpha}$  es sintetizada a partir del ácido araquidónico por la acción de la PGF sintasa (PGFS), que requiere NADPH para la reducción de la  $PGH_2$  a  $PGF_{2\alpha}$ . Por otro lado, la tromboxano sintasa (TXS) da lugar al  $TXA_2$ . Los receptores de la  $PGF_{2\alpha}$

y del TXA<sub>2</sub>, FP y TP respectivamente, incrementan la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> libre a través de la activación por G<sub>qα</sub> de la fosfolipasa C (PLC), con la subsiguiente producción de InsP<sub>3</sub> y diacilglicerol (Narumiya et al., 1999).

**Tabla 1.** Transducción de señales en los receptores de prostanoïdes

Tipo	Subtipo	Isoforma	Proteína G	Segundo mensajero
EP	EP <sub>1</sub>		Desconocida	↑ Ca <sup>2+</sup>
	EP <sub>2</sub>		G <sub>s</sub>	↑ AMPc
	EP <sub>4</sub>		G <sub>s</sub>	↑ AMPc
	EP <sub>3</sub>	EP <sub>3A</sub>	G <sub>i</sub>	↓ AMPc
		EP <sub>3B</sub>	G <sub>s</sub>	↑ AMPc
		EP <sub>3C</sub>	G <sub>s</sub>	↑ AMPc
		EP <sub>3D</sub>	G <sub>i</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub>	↓ AMPc, ↑ AMPc, PI
FP			G <sub>q</sub>	PI
IP			G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub>	↑ AMPc, PI
TP		TP <sub>α</sub>	G <sub>q</sub> , G <sub>i</sub>	PI, ↓ AMPc
		TP <sub>β</sub>	G <sub>q</sub> , G <sub>s</sub>	PI, ↑ AMPc

#### *b. Noradrenalina (NA)*

Tanto las arterias como las venas peneanas y el músculo liso trabecular reciben inervación adrenérgica responsable del estado de flacidez del pene debido a su actividad tónica contráctil a través de la liberación de noradrenalina (Andersson et al., 2001). Los nervios erectores están constituidos por fibras del sistema nervioso autónomo provenientes del plexo simpático hipogástrico (segmentos torácicos 12 y lumbares 1 y 2). Estos nervios discurren a lo largo de los cuerpos cavernosos y cuerpo esponjoso acompañando el recorrido de las arterias para desencadenar los fenómenos neurovasculares durante la erección y la detumescencia (Dail et al., 1993). La noradrenalina se libera desde las terminaciones nerviosas y se une a receptores α-adrenérgicos, provocando la vasoconstricción de las arterias helicinales y a nivel del cuerpo cavernoso la contracción del músculo liso trabecular lo que supone una reducción del flujo arterial y el colapso de los sinusoides cavernosos (Andersson y Wagner, 1995; Simonsen, et al., 1997; Simonsen et al., 2002). Junto con la noradrenalina se colocaliza en las fibras perivasculares simpáticas

el neuropéptido Y el cual posee efectos tanto contráctiles como relajantes, mediados estos últimos por el endotelio (Prieto et al., 2004).

En el cuerpo cavernoso humano, la densidad de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos es aproximadamente 10 veces superior a la de los  $\beta$ -adrenérgicos (Levin y Wein, 1980). Funcionalmente, se ha demostrado la existencia de receptores  $\alpha_1$ - y  $\alpha_2$ -adrenérgicos con predominio de los primeros tanto a nivel del hombre (Andersson y Wagner, 1995). La estimulación eléctrica de los nervios produce la contracción del músculo liso trabecular del pene por activación de los receptores postsinápticos  $\alpha_1$ -adrenérgicos, mientras que la vasoconstricción de la arteria cavernosa se lleva a cabo a través de una población mixta de receptores  $\alpha_1$ - y  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Hedlund et al., 1985; Morton et al., 2007). En las arterias peneanas de resistencia del caballo, la administración de agonistas y antagonistas selectivos de los receptores  $\alpha_1$ - y  $\alpha_2$ -adrenérgicos sugirió la presencia de una población mixta de adrenoceptores, pero tan solo los postsinápticos  $\alpha_1$  parecen estar implicados en las contracciones mediadas por la noradrenalina exógena y la estimulación eléctrica de los nervios (Simonsen et al., 1997). Este es caso de la arteria cavernosa, donde el prazosin también abolió las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica (Kun et al., 2003).

La liberación de noradrenalina desde las terminaciones nerviosas adrenérgicas se encuentra limitada por la acción de la misma sobre receptores presinápticos. Así, en el cuerpo cavernoso la inhibición de receptores  $\alpha_2$  incrementa la liberación de noradrenalina (Sáenz de Tejada et al., 1989b). Además, en las arterias peneanas del caballo, se ha demostrado que los receptores  $\alpha_2$  regulan la neurotransmisión NANC y su activación inhibe la liberación de NO (Simonsen et al., 1997). La inhibición de la liberación de NO por parte de los receptores  $\alpha_2$  presinápticos parece ser un mecanismo general que existe también en el músculo liso trabecular del pene (Cellek y Moncada, 1997) además del músculo liso arterial.

A nivel de las arterias, la noradrenalina causa contracción fundamentalmente a través de su unión a receptores  $\alpha_1$ . La activación de los receptores  $\alpha_1$  aumenta la concentración de calcio citosólico mediante la

activación de la PLC ( $G_q$ ) que da lugar a  $\text{InsP}_3$  y diacilglicerol (Jensen et al., 1992). La activación de los receptores  $\alpha_2$  inhibe a la enzima adenilato ciclasa gracias a la proteína reguladora inhibidora ( $G_i$ ) y ocasiona una disminución de la concentración intracelular de  $\text{AMP}_c$  (Jensen et al., 1992; Somlyo y Somlyo, 2000).

#### *b. Endotelinas*

En base a estudios funcionales e inmunocitoquímicos, se ha propuesto que las endotelinas contribuyen al mantenimiento del tono en el músculo liso del tejido eréctil (Andersson y Wagner, 1995). El péptido endotelina-1 es un potente vasoconstrictor en diferentes tipos de músculo liso peneano: cuerpo cavernoso, arteria cavernosa, vena dorsal profunda y venas circunflejas. Su síntesis puede iniciarse por la trombina, el factor derivado de plaquetas (PDF), la vasopresina o por efecto de las catecolaminas sobre células endoteliales (Yanagisawa et al., 1988). Los efectos de la endotelina-1 están mediados por su unión a receptores  $\text{ET}_A$ , los cuales se localizan en el músculo liso y por receptores  $\text{ET}_B$ , presentes en el músculo liso y en el endotelio vascular. Los receptores  $\text{ET}_A$  median procesos de contracción y de proliferación en las células musculares lisas. Los receptores  $\text{ET}_B$  del músculo liso promueven la contracción, mientras los localizados en el endotelio vascular la vasorelajación mediada por NO y prostaciclina (Mills et al., 2001a,b). Las contracciones inducidas por la endotelina-1 cuando se une a receptores  $\text{ET}_A$  en los sinusoides cavernosos se produce por incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  del músculo debido a la movilización del  $\text{InsP}_3$  que actúa sobre los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y por el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor (ROC) y/o canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje (VOC) (Holmquist et al., 1990; 1992). Contracciones de naturaleza similar se han encontrado en el cuerpo cavernoso humano por otras endotelinas como la endotelina-2 y la endotelina-3, aunque estas muestran menor potencia que la endotelina-1 (Andersson, 2001). La función de las endotelinas no sólo es regular el tono muscular sino también actuar como moduladores del efecto

contráctil de otros agentes, como la noradrenalina (Holmquist et al., 1990) o como modulador de la proliferación celular y expresión fenotípica (Zhao y Christ, 1995).

### *c. Angiotensina II*

La angiotensina II ejerce sus funciones biológicas a través de sus dos tipos de receptores: AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>. Estos receptores poseen siete segmentos transmembrana y pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G. Los receptores AT<sub>1</sub> poseen dos isoformas, AT<sub>1a</sub> y AT<sub>1b</sub>. Los receptores AT<sub>1a</sub> se expresan fundamentalmente en las células musculares lisas y células endoteliales, en el cerebro y en muchos otros tejidos, mientras que los receptores AT<sub>1b</sub> se localizan fundamentalmente en la corteza adrenal e hipófisis anterior (Gasc et al., 1994). La angiotensina II se une con alta afinidad a los receptores AT<sub>1</sub>, mientras que la angiotensina I y la angiotensina III muestran una menor afinidad por los mismos. Así, las acciones fisiológicas de la angiotensina II mediadas por los receptores AT<sub>1</sub>, incluyen vasoconstricción, crecimiento y proliferación celular, y estimulación de la secreción de vasopresina y aldosterona. Por el contrario, el papel fisiológico de los receptores AT<sub>2</sub> es menos conocido y la unión de la angiotensina II a ellos ofrece funciones opuestas a los AT<sub>1</sub> como son vasodilatación y procesos de antiapoptosis y antiproliferación (Yamada et al., 1996; Batenburg et al., 2004; Zimpelmann et al., 2001).

La vasoconstricción mediada por los receptores AT<sub>1</sub> ocurre a través de mecanismos dependientes e independientes de la elevación del Ca<sup>2+</sup> intracelular. La vía clásica implica la activación de la PLC, liberando Ins<sub>3</sub>P y diacilglicerol (DAG) y logrando así incrementar los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólicos. Además, estos receptores son capaces de activar la vía de RhoA/RhoK mediante un mecanismo independiente de Ca<sup>2+</sup> por inhibición de la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina (Ryan et al., 2004; Yin et al., 2006). Otro mecanismo importante asociado a los receptores AT<sub>1</sub> es la activación de la enzima NADPH oxidasa, incrementando así los niveles de especies reactivas de oxígeno, las cuales no solamente contribuyen a la reducción de la

biodisponibilidad del NO, sino que además estimulan la actividad de la enzima RhoK (Jin et al., 2004).

La participación del sistema renina-angiotensina en la regulación del tejido eréctil peneano ha sido demostrada en una gran variedad de estudios realizados tanto en animales como en humanos. Los péptidos de angiotensina, tanto la angiotensina I como la angiotensina II, han sido detectados en el cuerpo cavernoso y endotelio humanos (Kifor et al., 1997). Un estudio realizado en humanos determinó que el cuerpo cavernoso produce angiotensina II localmente. Durante la detumescencia, existe un incremento en el nivel de angiotensina II en sangre cavernosa en comparación con el estado de erección (Becker et al., 2000). Además, se ha caracterizado la presencia de receptores AT<sub>1</sub> tanto en el cuerpo cavernoso como en las células endoteliales del conejo (Park et al., 1997).

Estudios funcionales han demostrado que la angiotensina II no solamente es un potente agente vasoconstrictor en el pene, sino que es esencial para modular la función eréctil. *In vivo*, la inyección intracavernosa de angiotensina II causa el cese de la erección en perros anestesiados (Kifor et al., 1997), mientras que la administración de losartán (bloqueante selectivo de los receptores AT<sub>1</sub>) produce relajación a nivel del músculo liso e incrementa la presión intracavernosa (Kifor et al., 1997). En experimentos *in vitro*, la angiotensina II actúa contrayendo de manera dependiente de la concentración el músculo liso del cuerpo cavernoso, aunque sus contracciones resultan menores que las inducidas por la noradrenalina (Becker et al., 2000).

La inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> desenmascaran la implicación de la angiotensina II en los procesos fisiopatológicos del tejido eréctil peneano. El tratamiento con captopril parcialmente revirtió la disfunción eréctil y disminuyó la presión sanguínea en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Dorrance et al., 2002). Así, un mecanismo propuesto para la disfunción eréctil asociada a la hipertensión en ratas SHR es que la angiotensina II causa remodelado vascular en el pene. El músculo liso arterial y trabecular contiene colágeno tipo III y matriz extracelular que se encuentran significativamente incrementados en

las ratas SHR comparado con sus controles normotensos (Toblli et al., 2000, 2004). El tratamiento con losartán y candesartán no solamente normalizó la presión sanguínea, sino que previno los cambios estructurales en el tejido eréctil durante la hipertensión. La administración conjunta de losartán y de sildenafil mejoró además de los cambios morfológicos, la relajación dependiente del endotelio (Toblli et al., 2007).

El péptido angiotensina (1-7) se libera del cuerpo cavernoso y se ha demostrado que posee un papel importante en la función eréctil por su comportamiento como potente vasodilatador y antiproliferativo (Langeveld et al., 2005; da Costa Gonçalves et al., 2007). Su receptor *Mas* se ha localizado en el cuerpo cavernoso de la rata. La administración directa del péptido en el cuerpo cavernoso incrementó la presión intracavernosa inducida por la estimulación eléctrica del nervio pélvico en ratas. Además, dicho péptido potenció la liberación de NO por la estimulación eléctrica. Por otro lado, la delección del gen que codifica para el receptor *Mas* redujo la función eréctil como consecuencia de la fibrosis peneana y de la disminución de la respuesta del plexo pélvico a la estimulación eléctrica, proporcionando evidencias importantes del papel del fragmento peptídico 1-7 de la angiotensina y de su receptor en la fisiología de la erección (da Costa Gonçalves et al., 2007). Además, ha demostrado que la sobreexpresión del péptido angiotensina (1-7) en ratas transgénicas produce importantes efectos hemodinámicos y cardioprotectores teniendo una implicación funcional a nivel de la regulación vascular y del control de la presión sanguínea, particularmente bajo situaciones patológicas (Alenina et al., 2008).

## **2. DISFUNCIÓN ERÉCTIL Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

La disfunción eréctil o impotencia es una condición definida por *“la incapacidad consistente o recurrente de obtener y/o mantener una erección peneana suficiente para una relación sexual satisfactoria”* (Consenso de los Institutos Nacionales de Salud de USA). La disfunción eréctil está asociada con efectos adversos en la calidad de vida y, en particular, con el bienestar personal y las interrelaciones familiares y sociales; además, durante mucho

tiempo se ha subestimado la contribución de la disfunción eréctil a otras afecciones crónicas de la salud como la depresión (Laumann et al., 1999).

Anteriormente se consideraba que la mayoría de las causas de la disfunción eréctil eran de origen psicógeno, pero la evidencia actual sugiere que el 80% de los casos tienen una causa orgánica, aunque es común que existan ambas etiologías. La disfunción eréctil orgánica, que en un porcentaje muy alto de los casos es vasculogénica o debida a alteraciones en los vasos sanguíneos, es el resultado de la alteración de la vasodilatación tanto dependiente como independiente del endotelio, de la oclusión de las arterias penianas (por ejemplo debido a la aterosclerosis), o por una combinación de ambos factores. Además, el pequeño diámetro de dichas arterias y la elevada proporción de músculo liso y endotelio por volumen de tejido comparado con otros órganos, sugiere que el desarrollo de la disfunción eréctil en el varón es un indicador de enfermedad vascular sistémica (Montorsi et al., 2003; Billups et al., 2005). En última instancia, la disfunción eréctil puede considerarse como un proceso en el que la insuficiencia arterial está seguida de una incapacidad para la tumescencia debido a un llenado defectuoso de los sinusoides cavernosos y a una alteración en el mecanismo venooclusivo, aunque alteraciones iniciales en el cuerpo cavernoso y en el drenaje venoso primario también pueden constituir causas de disfunción eréctil (Broderick, 1998).

Diversos estudios epidemiológicos sugieren una correlación importante entre la disfunción eréctil y la edad, y entre disfunción eréctil y enfermedad vascular periférica. La prevalencia y severidad de la disfunción eréctil se incrementa con la edad. En un estudio inicial realizado en 1290 varones de raza caucásica con edades comprendidas entre los 40 y 70 años, Feldman y col. (1994) encontraron que un 52% de la población padecía disfunción eréctil. Datos proporcionados por la *National Health and Social Life Survery*, de un estudio que incluía 1410 varones, indicaron que aproximadamente el 16% de los varones menores de 40 años padecía disfunción eréctil (Laumann et al., 1999). Así, estos estudios revelaron que la edad es el factor de riesgo más importante asociado a la disfunción eréctil, aunque la fisiopatología de la disfunción eréctil es multifactorial e incluye numerosas causas como son las



vasculares, nerviosas, hormonales, iatrogénicas y psicógenas (Lue, 2000; Laumann et al., 1999), lo que sugiere que la edad actúa como factor de riesgo independiente. Numerosos estudios clínicos han demostrado que la disfunción eréctil posee una prevalencia elevada en varones con factores de riesgo vascular. La hipertensión, la dislipidemia, la diabetes, la obesidad y el sedentarismo junto con otros factores de riesgo como el tabaquismo también se encuentran fuertemente relacionados con la disfunción eréctil (Virag et al., 1985; Sullivan et al., 2001). Todo ello hace que la disfunción eréctil sea considerada como una verdadera enfermedad cardiovascular y en definitiva como un centinela de enfermedad vascular subclínica.

## **2.1. Disfunción eréctil y diabetes**

Numerosos estudios han estimado que el riesgo de padecer disfunción eréctil en el varón diabético es alto. El estudio realizado por Feldman y col. en 10000 varones, una vez ajustada la edad, señaló que la prevalencia de la disfunción eréctil era de un 51% en aquellos varones que padecían diabetes tipo 1 y un 37 % en aquellos con diabetes tipo 2. El estudio *Massachusetts Male Aging* mostró que la prevalencia de la disfunción eréctil en pacientes diabéticos era de un 50% frente un 24.8% en pacientes no diabéticos (Feldman et al., 1994; Johannes et al., 2000).

Diversos mecanismos fisiopatológicos son los responsables de la disfunción eréctil diabética. La alteración de la respuesta relajante del músculo liso trabecular mediada tanto por mecanismos neuronales como endoteliales ha sido demostrada tanto en humanos como en modelos animales diabéticos (Sáenz de Tejada et al., 1989a). El estrés oxidativo parece también tener un papel importante en el desarrollo de la disfunción eréctil en la población diabética. Así, se ha demostrado que la producción de aniones superóxido se encuentra significativamente aumentada en el cuerpo cavernoso de ratas diabéticas (Jeremy et al., 2000; Bivalacqua et al, 2005). Otra de las causas atribuidas a la disfunción eréctil diabética es la alteración en la producción de NO en el pene, tanto por la reducción en la expresión como en la disminución de la actividad de eNOS (Musicki y Burnett, 2007), la regulación a la baja de

mediadores del NO como son el GMP<sub>c</sub> (Bivalacqua et al., 2004) y la PKG (Chang et al., 2004) en el cuerpo cavernoso o la falta de cofactores (Escrig et al., 2002) o sustratos (Gur et al., 2000) esenciales para la actividad de la eNOS.

Otros dos mecanismos que se encuentran involucrados en la disfunción eréctil diabética son la activación de la proteína quinasa C (PKC) y la formación de productos de glucosilación avanzada. La actividad incrementada de la isoforma beta de la PKC se ha relacionado con la vasculopatía y neuropatía diabéticas (Nangle et al., 2003), y además los niveles incrementados de la enzima asociados con una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno en el músculo liso trabecular también han sido propuestos como parte de los cambios fisiopatológicos que acontecen en la disfunción eréctil asociada con la diabetes (Ganz y Seftel, 2000).

El mecanismo mejor caracterizado asociado con la disfunción endotelial en los vasos sanguíneos incluyendo los del pene durante la diabetes es la hiperglucemia. El producto de glucosilación avanzada mayormente implicado en la disminución de la producción de NO en la disfunción eréctil en pacientes diabéticos es la N-acetilglucosamina (O-GlcNAc). Recientemente Musicki y col. (2005a) han demostrado que la hiperglucemia producía un descenso de la fosforilación específica de eNOS en el residuo de Ser1177 debido a la O-GlcNAc, impidiendo tanto su actividad basal como la mediada por el *shear stress* o por factores de crecimiento como el VEGF. Sin embargo, estudios *in vitro* han sido incapaces de reproducir estos resultados: la hiperglucemia reguló negativamente la expresión total de eNOS, pero no alteró el estado de fosforilación de eNOS en Ser1177 (Wessells et al, 2006).

Además de los efectos debidos a la reducción de la actividad de la NOS y la producción de NO, la patogénesis de la disfunción eréctil diabética está también asociada con una respuesta contráctil incrementada, tanto la producida por agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos como por otros factores contráctiles como la endotelina-1, el TXA<sub>2</sub> y estando implicados procesos de sensibilización al Ca<sup>2+</sup> mediados por la vía RhoA//RhoK. Aunque la regulación de todos estos mecanismos resulta crucial para desencadenar el fenómeno de la erección, se

encuentran comprometidos en la disfunción eréctil diabética en mayor o menor medida. Estudios previos han demostrado que la alteración de la respuesta contráctil a nivel peneano depende tanto de la duración de la diabetes como del modelo animal utilizado (Mills et al., 1998; Nangle et al., 2006a,b). Así, mientras algunos estudios han demostrado que las respuestas contráctiles a la estimulación eléctrica de los nervios adrenérgicos no se encuentran alteradas ni por la diabetes ni por su tratamiento (Keegan et al., 2000), otros estudios indican que la contractilidad se encuentra incrementada, tanto la mediada por la administración exógena de noradrenalina como por la producida por estimulación eléctrica de los nervios (Luttrell et al., 2008). Por otra parte, Sullivan y col. (1997) proporcionaron evidencia de la sobreexpresión de los receptores de endotelina a nivel del cuerpo cavernoso de animales diabéticos comparados con sus controles sanos. Asimismo, los animales diabéticos mostraron una sensibilidad incrementada a la endotelina-1. En este mismo sentido, Angulo y col. (2006) demostraron que las respuestas contráctiles del cuerpo cavernoso mediadas por el receptor TP se encontraban aumentadas en varones diabéticos.

Por otro lado, el interés por el papel que juega la enzima RhoK en el en el tejido eréctil peneano durante la diabetes se ha centrado en la interacción entre el NO derivado del endotelio y la proteína RhoA. Así, Chitale y col. (2001) han demostrado que esta vía de señalización está implicada en la acción vasodilatadora del NO en el tejido eréctil, y recientemente se ha descrito que la regulación a la baja de la enzima eNOS que se produce en el cuerpo cavernoso durante la diabetes está mediada por activación de la ruta RhoA/RhoK (Bivalacqua et al., 2004a). Recientemente, se ha estudiado el efecto de la diabetes y la suplementación de testosterona sobre la vía de señalización de RhoA/RhoK, así como la respuesta a un inhibidor selectivo de RhoK Y-27632 en animales diabéticos (Vignozzi et al., 2007). Este estudio demostró que en la diabetes la testosterona mejoraba la función eréctil mediante la regulación a la baja de la vía RhoA/RhoK (Vignozzi et al., 2007),

## **2.2. Disfunción eréctil y disfunción endotelial**

La disfunción eréctil tiene una prevalencia elevada en pacientes con enfermedades vasculares tales como la enfermedad arterial coronaria, enfermedades cerebrovasculares, diabetes e hipertensión arterial. Por otra parte, existe un incremento del riesgo de padecer eventos cardiovasculares como la angina, el infarto de miocardio y el infarto cerebral en pacientes con disfunción eréctil (Chew et al., 2008). Desde un punto de vista fisiopatológico, la disfunción endotelial es uno de los nexos entre la disfunción eréctil y la enfermedad cardiovascular, lo cual podría ser explicado en base a: (1) el endotelio posee un papel esencial en la fisiología de la erección (Sáenz de Tejada et al., 2004; Prieto, 2008), (2) la disfunción endotelial con frecuencia subyace a enfermedades vasculares como la enfermedad coronaria (Solomon et al., 2003), (3) la disfunción endotelial sistémica posee una repercusión grande en el desarrollo de la disfunción eréctil, y aunque no afecta únicamente al pene, al ser éste un órgano altamente irrigado resulta altamente afectado (Mazo et al., 2006).

El endotelio vascular peneano posee un papel muy importante tanto en la modulación del tono vascular como del flujo sanguíneo hacia el pene en respuesta a estímulos de tipo humoral, nervioso y mecánico (Sáenz de Tejada et al., 2004; Prieto, 2008). En la disfunción eréctil vasculogénica el papel regulador que posee el endotelio se encuentra alterado como resultado de un descenso en su viabilidad y/o menor respuesta a mediadores de tipo vasodilatador, lo cual probablemente se suma a un incremento de los niveles y/o de la sensibilidad a agentes vasoconstrictores (Sáenz de Tejada et al., 2004).

### **2.2.1. Causas de disfunción endotelial**

La disfunción eréctil es principalmente una enfermedad vascular. Toda una variedad de factores, comentados anteriormente, se asocian con una función eréctil alterada y además caracterizan la disfunción eréctil vasculogénica en el varón. De hecho, se considera a la disfunción eréctil como una manifestación temprana de disfunción endotelial sistémica. Los factores

que están asociados a la disfunción endotelial incluyen alteraciones en la expresión y actividad de eNOS, el estrés oxidativo y el envejecimiento. Estos mecanismos no participan de forma individual en la patógenesis de la disfunción eréctil sino que la mayoría de ellos actúan de forma conjunta. Se pueden resumir en los siguientes aspectos:

*a. Alteraciones en la expresión de eNOS.*

La información que existe sobre las variaciones en la expresión de eNOS en el pene en la disfunción eréctil vasculogénica es controvertida. Mientras que se ha descrito que el RNAm que codifica para eNOS y la expresión de la proteína en el pene de animales envejecidos pueden encontrarse disminuidos (Rajasekaran et al., 2002) o aumentados (Haas et al., 1998; Bakircioglu et al., 2001), la expresión de eNOS en el pene de animales diabéticos está aumentada (Bivalacqua et al., 2004b) o inalterada (Escrig et al., 2002). Bajo condiciones fisiológicas, el incremento del contenido de la proteína eNOS está asociado con un incremento de la actividad enzimática. Sin embargo, la alteración de la función endotelial no está causada necesariamente por la regulación a la baja de la enzima. Los niveles elevados de proteína en el pene quizás actúen como mecanismo compensador para disminuir la producción disminuida de NO en un esfuerzo de mantener la homeostasia en el pene, aunque los niveles activos de la enzima se encuentren reducidos.

*b. Alteraciones en la regulación posttraslacional de la eNOS*

Como se ha comentado anteriormente, la enzima eNOS está sujeta a un elevado control postraslacional, diversas situaciones fisiológicas, como la edad o patológicas, como la hipercolesterolemia o la diabetes (ver apartado 2.1.) contribuyen a la alteración de este proceso. Uno de los mecanismos más importantes que relacionan la disfunción eréctil con la edad es la inactivación de eNOS por pérdida de la regulación de su estado de fosforilación. La fosforilación dependiente de Akt del residuo Ser1177 en eNOS se encuentra disminuida, mientras la fosforilación en el residuo Thr495 está incrementada, a pesar que la expresión de la proteína está también incrementada (Musicki et al,

2005b). Así, la fosforilación del residuo Ser1177 en el pene de ratas envejecidas se encuentra disminuida en respuesta a la vasodilatación inducida por flujo provocada por la estimulación eléctrica del nervio cavernoso, probablemente debido a una fosforilación incrementada en el residuo Thr495 de eNOS, el cual previene la fosforilación dependiente de la Akt en Ser1177 (Musicki et al, 2005b). Sin embargo, la señalización mediada por VEFG se encuentra inalterada. La función eréctil en ratas envejecidas puede ser mejorada como consecuencia del tratamiento a largo plazo con sildenafil. Así, la presencia continua de sildenafil logra incrementar los niveles de GMP<sub>c</sub> promoviendo la relajación del músculo liso trabecular y arterial (incrementándose así el flujo sanguíneo peneano) y activando el fenómeno de vasodilatación inducida por flujo sobre las células endoteliales, logrando así la activación de eNOS por fosforilación en Ser1177 por la Akt. En otro modelo animal de disfunción eréctil, en el que los animales poseen lesión del nervio cavernoso, el tratamiento crónico con sildenafil también indujo la fosforilación de eNOS (Ser1177) en un mecanismo dependiente de Akt (Mulhall et al, 2008) preservándose así la función eréctil.

El papel de la hipercolesterolemia en la alteración de la fosforilación de eNOS es controvertido. Así, mientras la cantidad de eNOS fosforilado (Ser1177) en el pene no se ha encontrado alterada ni en el cerdo (Musicki et al, 2008) ni en el ratón, otros estudios han revelado que se encuentra incrementado tanto en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol (Ryu et al, 2006a, b) como en conejos (Xie et al, 2005). Esta disparidad quizás sea debida a la diferente progresión de aterogénesis y a las diferentes especies animales estudiadas. En células endoteliales expuestas a condiciones aterogénicas, las lipoproteínas de baja densidad en estado oxidado (Pritchard et al, 2002), atenúan (Chavakis et al, 2001), o no poseen efecto (Fleming et al, 2005) sobre la fosforilación de eNOS en el residuo Ser1177, mientras decrecen la fosforilación en Thr495, permitiendo el desacoplamiento de eNOS y la formación de anión superóxido (Fleming et al, 2005). Esto podría ser debido a que la aterosclerosis podría estar asociada con un incremento en el flujo de electrones desde el domino reductasa al oxigenasa de eNOS, incrementando

así el estado de activación de la enzima, pero en un estado desacoplado en cuanto a la síntesis de NO. En un modelo de hipercolesterolemia en ratas, se ha demostrado que la combinación de factores inductores de la angiogénesis (angiopoyetina 1 y VEGF) revierte la disfunción eréctil y la fosforilación alterada de eNOS (Ser1177) así como la función endotelial peneana (Ryu et al, 2006a).

Numerosos estudios han evaluado el nivel de expresión de caveolina-1 en el pene en la disfunción eréctil vasculogénica con resultados controvertidos. Mientras la edad y la diabetes disminuyen la expresión de caveolina-1 en el pene de la rata (Bakircioglu et al, 2001), la hipercolesterolemia la incrementa (Bakircioglu et al, 2000) o incluso no se ve afectada (Musicki et al, 2008) en el pene de rata y porcino, respectivamente. Sin embargo, no parece que la expresión de caveolina-1 determine la actividad de eNOS. Un estudio reciente muestra que los niveles de caveolina-1 unida a eNOS disminuyen a nivel de pene en condiciones de hipercolesterolemia (Musicki et al, 2008). La interacción de eNOS con la caveolina-1 aparentemente previene la activación de eNOS y contribuye a la disfunción endotelial peneana asociada a la hipercolesterolemia. Tanto una dieta baja en grasas como el ejercicio crónico preservaron la función endotelial en el pene de animales con aterosclerosis mediante mecanismos que implicaban el cese de la interacción de eNOS con la caveolina-1 (Musicki et al, 2008).

### c. Alteraciones en los niveles de cofactores y sustratos de la eNOS y desacoplamiento de la enzima

Bajo ciertas circunstancias, eNOS puede generar anión superóxido en lugar de NO, fenómeno que se debe fundamentalmente a la disminución de las cantidades de su cofactor BH<sub>4</sub>, y que se denomina *desacoplamiento* de la oxidación de NADPH en la síntesis de NO. La generación de anión superóxido está mediada a través del grupo hemo de su dominio de oxigenasa y es dependiente de la presencia de su sustrato arginina, y su cofactor BH<sub>4</sub>. Cuando la concentración de alguno de estos dos últimos es relativamente baja, eNOS genera aniones superóxido en lugar de NO. El anión superóxido reacciona con el NO para dar lugar a peroxinitrito, pero también reduce la actividad funcional

de eNOS debido a que el flujo de electrones se traslada desde la L-arginina a la molécula de oxígeno. Es a este nivel donde las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa tienen un papel importante en la eliminación de radicales libres. El balance entre la producción y eliminación de radicales libres tiene un papel crucial en la disfunción endotelial presente en la disfunción eréctil de manera aislada o asociada con otras enfermedades vasculares como la hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes o el envejecimiento. En el tejido peneano se ha documentado la reducción de dímeros activos de eNOS en ratas viejas comparadas con ratas jóvenes o incluso niveles preservados de la enzima y de la función endotelial en animales sometidos a dietas pobres en grasa y a ejercicio físico (Musicki et al., 2008).

#### d. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

En estudios *in vitro* se ha establecido que el estrés oxidativo o incremento de las especies reactivas de oxígeno es un elemento esencial en el desarrollo de disfunción endotelial. Además, el descenso de los niveles plasmáticos y/o tisulares de elementos antioxidantes como las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, glutatión (GSH) y el ácido ascórbico tienen un papel fundamental en la patogénesis de dicha disfunción. La producción de especies reactivas de oxígeno causa daño vascular y disfunción endotelial alterando las vasodilataciones dependientes del endotelio por oxidación del NO a peroxinitrito, lo que conlleva la activación del NF- $\kappa$ B, el cual inicia una respuesta inflamatoria en la pared vascular y la producción de diferentes moléculas de adhesión. Además, el peroxinitrito puede actuar como factor contráctil (Endemann y Schiffrin, 2004), incrementando la contractilidad del tejido eréctil y contribuyendo así a la disfunción eréctil.

La interacción entre el NO y las especies reactivas de oxígeno es uno de los mecanismos más importantes implicados en la fisiopatología de la disfunción eréctil (Jones et al., 2002). La producción incrementada de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido) y de peroxinitrito reduce la biodisponibilidad del NO, produciendo a largo plazo daño endotelial y un descenso en la relajación del músculo liso arterial y trabecular del pene, siendo



ésta una de las principales causas de disfunción eréctil. El trabajo pionero de Jeremy y col. (2000) estableció la hipótesis en la que la interacción entre las plaquetas y neutrófilos, la liberación masiva de moléculas de adhesión y la liberación de aniones superóxido, promueven la vasoconstricción limitando así el proceso de erección. Por otro lado, estableció una nueva vía para el estudio de agentes antioxidantes con el objeto de paliar la disfunción eréctil asociada al estrés oxidativo bajo situaciones patológicas tales como la hipertensión, en las que los altos niveles de angiotensina II están asociados con un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Ruiz-Ortega y Ortiz, 2005; Briones et al., 2009). También en la diabetes, se ha encontrado una diferencia significativa en el incremento de de la presión intracavernosa, indicativo de la función eréctil, obtenida en animales diabéticos tratados con una agente antioxidante (vitamina E) más sildenafil comparados con los no tratados (De Young et al., 2004).

Por otro lado, la acumulación de radicales libres y la lesión endotelial causada por los mismos posee un papel importante durante el proceso de envejecimiento (Ames et al., 1993; Ferrara et al., 1995). Aunque no existen evidencias apoyando que la terapia con vasodilatadores disminuye el estado de oxidación en la pared vascular, ésta si contribuye a reducir la hipoxia (factor importante y desencadenante del estrés oxidativo) y quizás sea un factor importante que contribuye a su descenso (Sommer y Engelmann, 2004).

### **2.3. Disfunción eréctil y enfermedad arterial coronaria**

Se ha sugerido que la disfunción eréctil es una manifestación más de la enfermedad vascular (Sullivan et al., 1999) y estudios clínicos han demostrado, por ejemplo, que en pacientes con diabetes tipo 2 existe una fuerte correlación entre la disfunción eréctil y enfermedad arterial coronaria silente, lo que ha llevado a la propuesta que la disfunción eréctil podría ser utilizada como marcador potencial para el *screening* de enfermedad coronaria silente en pacientes diabéticos (Gazzaruso et al., 2004). La disfunción eréctil está presente en pacientes con enfermedad coronaria tanto subclínica como sintomática (Montorsi, et al., 2003) y además se presenta antes de la aparición

de eventos tanto agudos como crónicos a nivel coronario (Montorsi et al., 2005). Así, la disfunción eréctil precede a los síntomas de enfermedad coronaria en aquellos pacientes con disfunción eréctil de etiología vascular, de ahí que la disfunción eréctil sea considerada como marcador o centinela del desarrollo de enfermedad arterial coronaria (Vrentzos et al., 2007). La teoría propuesta por Montorsi y col. (2005) denominada *“hipótesis del diámetro arterial”* establece el mecanismo(s) potencial(es) desde un punto de vista fisiopatológico por el cual la disfunción eréctil y la enfermedad coronaria están asociadas. Así, el diámetro diferente de los vasos sanguíneos hace que la presencia de una placa arteriosclerótica de igual tamaño presente en las arterias de resistencia peneanas comprometa en primer lugar el flujo sanguíneo peneano y por tanto cause disfunción eréctil comparada con la misma cantidad de placa en arterias de mayor diámetro como son las coronarias. Esta sería la causa por la cual los vasos de mayor calibre toleran mejor la misma cantidad de placa comparados con los pequeños. Así, pacientes con >50% de obstrucción de la arteria peneana no mostrarán afectada de manera crítica la circulación coronaria debido a su mayor diámetro, siendo éste un posible mecanismo que explica la falta de desarrollo de enfermedad coronaria durante las etapas tempranas de disfunción eréctil. En el caso de la obstrucción >50% de las arterias coronarias, el lumen de las arterias peneanas se verá reducido de manera severa, lo que sugiere un mecanismo para la coexistencia de disfunción eréctil y síndromes coronarios agudos como la angina de pecho. Si esta hipótesis es válida, entonces se puede considerar que (1) la disfunción eréctil y la enfermedad coronaria deberían ser considerados como dos aspectos diferentes de la misma enfermedad, (2) la prevalencia de la enfermedad cardiovascular no diagnosticada en pacientes con disfunción eréctil debería ser baja, (3) la prevalencia de disfunción eréctil en pacientes con enfermedad coronaria debería ser elevada, y (4) en la mayoría de los casos, la disfunción eréctil debería preceder a los síntomas de la enfermedad arterial coronaria (Montorsi et al., 2003; Montorsi et al., 2005).

### **3. PAPEL FISIOLÓGICO DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA VASOCONSTRICCIÓN ARTERIAL**

La contracción del músculo liso se inicia por elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol celular. Al igual que en otros tipos celulares, esta elevación es debida bien a la entrada directa de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular o bien a su liberación de los depósitos intracelulares fundamentalmente procedente del retículo sarcoplásmico. Por tanto, la contracción muscular puede iniciarse por neurotransmisores excitadores, hormonas o autacoides que favorezcan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  o su liberación de los depósitos intracelulares.

El mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mejor caracterizado en las células musculares es el de los canales VOC, particularmente los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L sensibles a las dihidropiridinas. Sin embargo, las células musculares lisas poseen otros tipos de canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  que no son dependientes de cambios en el voltaje, como son los canales ROC, los cuales son activados por agonistas que se unen a receptores acoplados a proteínas G, y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por almacén (SOC), activados tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico (McFadzean y Gibson, 2002). Un caso particular de canales ROC son los canales operados por ligando como los receptores  $\text{P2X}_1$  encontrados en el músculo liso en los que la unión de ATP induce una despolarización rápida y transitoria del músculo debida a la activación de un canal no selectivo de cationes que es altamente permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  (Suzuki, 1985; Benham y Tsien, 1987).

El  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como mensajero en una multitud de procesos a nivel intracelular. En el músculo liso, un incremento de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico permite la fosforilación de las cadenas reguladoras ligeras de miosina ( $\text{MLC}_{20}$ ) y la contracción mediante un mecanismo que clásicamente se considera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . La miosina nativa es un hexámero que está compuesto por dos cadenas pesadas de 230-kDa cada una, y dos pares de cadenas ligeras un par de 20-kDa cada una, y otro par de 17-kDa cada una. El  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre se une a la CaM, una proteína que une de forma cooperativa hasta cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$ ; dicha interacción induce un cambio conformacional en la CaM que conlleva la exposición de sitios de interacción

con proteínas diana, una de las cuales es la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). La interacción de la CaM con la MLCK provoca su activación con el resultado de la fosforilación de la  $MLC_{20}$  en el residuo de serina (Ser)-19. Esta fosforilación desencadena la formación de puentes cruzados actina-miosina provocando contracción muscular. El cese de la contracción es debido por una parte al descenso en la  $[Ca^{2+}]_i$  con el consiguiente descenso de la actividad de la MLCK, y por otra parte a que la  $MLC_{20}$  es desfosforilada por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP). Así, la fosforilación reversible de la  $MLC_{20}$  tiene un papel importante en la regulación de la contracción del músculo liso vascular. (Somlyo y Somlyo, 1994; Somlyo y Somlyo, 2000; Somlyo y Somlyo, 2003). Sin embargo, la estimulación del músculo liso con agonistas normalmente origina un desarrollo de fuerza para una elevación determinada de la  $[Ca^{2+}]_i$ , mayor que el provocado por la despolarización de la membrana. Además, la relación  $Ca^{2+}$ -tensión también cambia durante el curso de la contracción; la fase sostenida de la contracción es mantenida por un nivel de  $Ca^{2+}$  relativamente menor. Cuando la contracción está producida sin una elevación proporcional de la  $[Ca^{2+}]_i$  este proceso se denomina sensibilización al  $Ca^{2+}$  o incremento de la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  de la maquinaria contráctil, en el que la regulación de la actividad de la MLCP tiene un papel fundamental. (Somlyo y Somlyo, 1994). Aunque el mecanismo que interviene en la sensibilización al  $Ca^{2+}$  es complejo, se considera la vía de RhoA/RhoK como el más aceptado, a pesar de intervenir otras quinasas como la PKC o la tirosina quinasa (TK) (Somlyo y Somlyo, 1994; Masuo et al., 1994; Somlyo y Somlyo, 2000).

### **3.1. Mecanismos de activación de la entrada de $Ca^{2+}$ en el músculo liso**

Las células musculares lisas se caracterizan por su diversidad y plasticidad. Así, los mecanismos que controlan la contracción también muestran una diversidad similar en la que cada tipo de célula muscular posee sistemas de señalización intracelular que dependen y se adaptan a la función que en particular va a desempeñar. En general, el acoplamiento excitación-contracción en el músculo liso sucede a través de dos mecanismos principales.

Aunque en última instancia el  $\text{Ca}^{2+}$  posee una función moduladora y/reguladora de diversos procesos a nivel intracelular, incluida la contracción, resulta importante estudiar aquellos mecanismos por los que la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  se activa. Como la despolarización de la membrana plasmática juega un papel crucial en la activación de la contracción, este es un mecanismo que debe ser estudiado en profundidad, aunque también hay ciertos tipos de músculo liso donde la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares es importante.

### **3.2. Canales iónicos**

Numerosos estudios previos han sugerido la existencia de diversas vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en células a partir del uso de técnicas de electrofisiología y de fluorescencia. Basados en el modo de activación, éstas se clasifican de forma general en canales VOC, los cuales son activados directamente por la despolarización de la membrana, y entradas de  $\text{Ca}^{2+}$  no operadas por voltaje, las cuales incluyen aquellas que son activadas en respuesta a la estimulación de un receptor de membrana (ROC o la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante un mecanismo diferente al de la entrada capacitativa) (Large, 2002) o por la depleción de los depósitos intracelulares (entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por almacén -SOC- o entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa -CCE-) (Parekh y Putney, 2005).

#### **3.2.1. Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ a través de canales operados por voltaje**

La superfamilia de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje incluye las subfamilias L-, N-, P/Q- y R-, clasificadas en base a la similitud en las secuencias de aminoácidos y a sus características electrofisiológicas. Los siguientes apartados resumen las características estructurales y funcionales de los canales pertenecientes a las familias L- y T- a nivel del músculo liso.

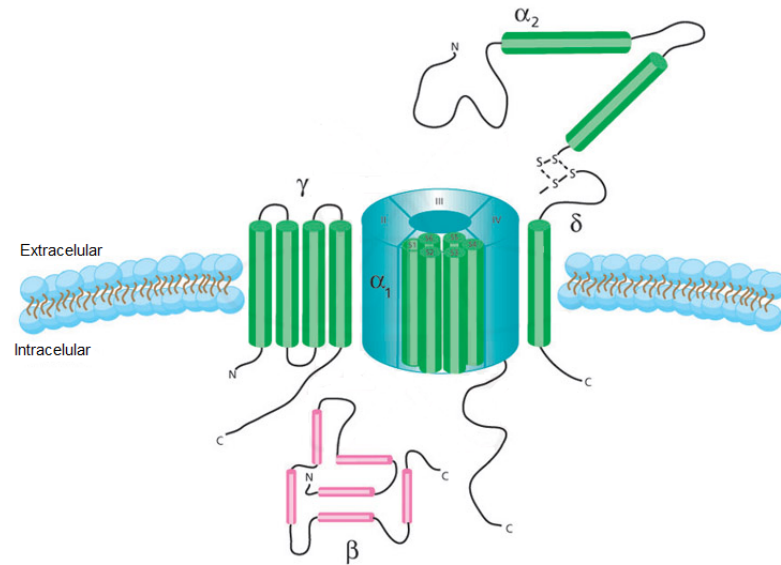
##### ***3.2.1.1. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por voltaje tipo L***

Desde de un punto de vista funcional, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L se caracterizan porque su activación es voltaje dependiente (su potencial de activación depende del tipo celular) y por sus corrientes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  amplias y de larga duración (Smirnov y Aaronson, 1992). La mayor parte del

$\text{Ca}^{2+}$  que activa la contracción en el músculo liso durante los periodos de despolarización celular procede tanto de la entrada a través de canales VOC del tipo L localizados en la membrana plasmática como de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico mediada por receptor (Somlyo y Somlyo, 1994; Bolton et al., 1999). Así, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L mediante su función ionotrópica clásica contribuyen a la contracción no sólo por mediar en parte la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular al citoplasma, sino también por participar en los procesos en los que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares en el retículo sarcoplásmico. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico al citoplasma puede ser mediada a través de  $\text{InsP}_3$  (Bitar et al., 1986; Putney, 1987), por la activación de receptores de membrana por agonistas por estimulación de la PLC (Barnard et al., 1994) o por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  debida a la activación de los receptores de rianodina (RyR) (Collier et al., 2000). Sin embargo, recientemente se ha propuesto un nuevo papel de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L como sensores metabotrópicos en las células de músculo liso vascular que actuarían como sensores de voltaje y activarían proteínas G asociadas a la ruta de la PLC e  $\text{InsP}_3$ . Este último mensajero difunde a lo largo del citoplasma y se une a receptores  $\text{InsP}_3\text{R}$  en el retículo sarcoplásmico que inducen la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol. La amplificación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  es lograda por la subsiguiente activación de los receptores de RyR, induciendo así contracción arterial (Ureña et al., 2007). La activación simultánea de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  por despolarización de la membrana está potenciada por agonistas como el ATP que modulan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  facilitando la contracción arterial lo que podría tener implicaciones en determinadas situaciones fisiopatológicas (Del Valle-Rodríguez et al., 2006). La implicación de los canales VOC en el proceso de detumescencia ha sido descrita recientemente en el cuerpo cavernoso del conejo, proporcionándose evidencias de que la regulación de este tipo de canales es importante en el mantenimiento del tono del tejido eréctil (McCloskey et al., 2009). Así, en los miocitos de cuerpo cavernoso se expresan dos tipos de canales VOC, una corriente tipo L y una corriente putativa tipo T.

*Estructura del canal VOC tipo L.* Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L constan a nivel estructural de un complejo proteico compuesto por una subunidad  $\alpha_1$  que define el poro iónico y otras subunidades auxiliares, incluyendo una subunidad  $\beta$  de localización intracelular y una de localización extracelular, la subunidad  $\delta$  que se encuentra unida a la subunidad  $\alpha_2$  a través de puentes disulfuro ( $\alpha_2/\delta$ ). La subunidad  $\alpha_1$  consta de cuatro dominios estructurales (I a IV) cada uno de los cuales posee seis segmentos transmembrana ( $S_1$ - $S_6$ ) unidos entre sí. El sensor de voltaje se encuentra en el dominio  $S_4$ . Esta subunidad está codificada por cuatro genes diferentes que por maduración post-transcripcional (corte y empalme alternativo) dan lugar a diferentes variantes denominadas  $\text{Ca}_v1.2a$  y  $\text{Ca}_v1.2b$ . El peso molecular de cada una de ellas es  $\sim 240$  kDa (Keef et al., 2001).

Existen cuatro genes diferentes que codifican para las subunidades  $\beta$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje. En el músculo liso, existen como cuatro subunidades  $\beta$  diferentes ( $\beta_{1-4}$ , con un peso molecular de 54-68 kDa) (Birnbaumer et al., 1994). De éstas, se han identificado hasta tres diferentes en el músculo liso ( $\beta_{1b}$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) (Bielefeldt, 1999; Collin et al., 1994; Gollasch et al., 1998; Hullin et al., 1992). A diferencia de la subunidad  $\alpha_1$ , las subunidades  $\beta$  no contienen segmentos transmembrana, aunque sí regiones hidrofóbicas, y además mantienen una interacción con la subunidad  $\alpha_1$  a través de sus dominios I y II (Pragnell et al., 1994). El complejo  $\alpha_2/\delta$  ( $\sim 175$  kDa) consiste en un complejo formado por la subunidad extracelular  $\alpha_2$  con la subunidad  $\delta$  (Angelotti y Hofmann, 1996). El dominio  $\alpha_2$  proporciona la ayuda estructural necesaria para la activación del canal, mientras el dominio  $\delta$  modula la activación dependiente de voltaje (Keef y et al., 2001). La subunidad  $\gamma$  es una glucoproteína que posee cuatro segmentos transmembrana (Figura 3).



**Figura 3. Estructura de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  operado por voltaje.** Consta de una subunidad  $\alpha_1$  y tres subunidades auxiliares,  $\alpha_2$ - $\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Las subunidades  $\alpha_1$  poseen cuatro dominios homólogos (I-IV) constituidos por seis segmentos transmembrana. La subunidad está localizada intracelularmente. La subunidad  $\alpha_2$  está altamente glucosilada y está en el lado extracelular unida a través de puentes disulfuro con la subunidad  $\delta$ . La subunidad  $\gamma$  es una glucoproteína que posee cuatro segmentos transmembrana.

*Regulación del canal VOC tipo L por proteína quinasas.* Los canales VOC son modulados por numerosos sistemas de señalización. Se ha descrito que la PKC puede incrementar las corrientes  $\text{Ca}_V1.2b$  en diferentes tipos de músculo liso (Lepretre et al., 1994; Schuhmann et al., 1994; Shimamura et al., 1994; Zhong et al., 1999). La PKC es una serina/treonina quinasa que posee una región N-terminal reguladora y una C-terminal catalítica que es activada por el DAG producido por diferentes agonistas tales como la noradrenalina, endotelina, angiotensina II y serotonina. Las bases moleculares de la regulación de los  $\text{Ca}_V1.2b$  por la PKC han sido ampliamente estudiadas, sin embargo existe poca información acerca de los mecanismos implicados presentes en el músculo liso a diferencia del músculo cardíaco donde se ha demostrado que la PKC forma un complejo con la subunidad  $\alpha_{1c}$  a través del extremo C-terminal permitiendo la fosforilación del canal en el residuo Ser1928, sitio descrito previamente que interviene en la activación del canal por otra proteína quinasa, la PKA, demostrándose que ambas convergen en un mismo sitio de fosforilación específico para la actividad del canal (Yang et al., 2005)



que la implicación de las diferentes isoformas de la PKC fosforilan diferentes residuos de la subunidad  $\alpha_{1c}$  lo que tiene diferentes efectos sobre la actividad del canal (Yang et al., 2009).

La PKA también modula la actividad de los canales  $Ca_v1.2a$  y  $Ca_v1.2b$  en el músculo liso. De manera específica, diversos estudios lo han clarificado mostrando que el análogo del  $AMP_c$ , 8-Br- $AMP_c$ , aumenta las corrientes  $Ca_v1.2b$  (Ishikawa et al., 1993; Ruiz-Velasco et al., 1998), efecto bloqueado por inhibidores de PKA (Kimura et al., 2000); así como la activación de la adenilato ciclasa con forskolina (Ishikawa et al., 1993; Shi et al., 1995) o directamente con la subunidad  $G_{\alpha s}$  (Xiong y Sperelakis, 1995; Zhong et al., 1999) aumentan las corrientes  $Ca_v1.2b$ . Además, se ha demostrado que la acción de la PKA sobre los canales  $Ca_v1.2b$  requiere de la proteína ancorina quinasa A (AKAP) (Zhong et al., 1999).

El papel de la PKG en la relajación del músculo liso está bien establecido; entre los diferentes mecanismos atribuidos a la PKG en la reducción de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular se encuentra su acción inhibitoria sobre los canales  $Ca_v1.2b$ . Así, se ha demostrado que el NO, los donantes de NO como el nitroprusiato sódico y el análogo del  $GMP_c$  8-Br- $GMP_c$  reducen las corrientes  $Ca_v1.2b$  (Xiong et al., 1994; Tewari y Simard, 1997; Quignard et al., 1997; Ishikawa et al., 1993), inhibición revertida por los inhibidores de la PKG (Tewari y Simard, 1997; Ruiz-Velasco et al., 1998). Sin embargo, el mecanismo implicado en la reducción de su actividad se encuentra todavía sin establecer. Un elevado número de estudios han contemplado también la regulación de los canales  $Ca_v1.2$  por otras quinasas como son las tirosina quinasas. La primera evidencia de la implicación de la proteína tirosina quinasa en la regulación de los canales  $Ca_v1.2b$  a nivel vascular fue realizada por Wijetunge y col. (1992). La inhibición de las tirosina fosfatasas (Wijetunge et al., 1998) o la activación endógena de la tirosina quinasa de la familia *c-Src* (Wijetunge y Hughes, 1996) incrementaron las corrientes en miocitos arteriales de la oreja del conejo. Se ha propuesto la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  de los canales  $Ca_v1.2$  como mecanismo principal implicado en la apertura de los canales en la regulación de la contracción vascular sometidas a soluciones hipoosmóticas (Wijetunge y

Hughes, 2007). En el tejido eréctil se ha demostrado la implicación de las tirosina quinasas en la vasoconstricción peneana mediante la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales VOC de tipo L, y por tanto situando a los inhibidores de las tirosina quinasas en el mantenimiento y/o mejora de la función sexual y pudiendo ser considerados como una nueva alternativa terapéutica ante el tratamiento de la disfunción eréctil (Villalba et al., 2010).

### *3.2.1.2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por voltaje tipo T*

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T son activados a potenciales de membrana relativamente hiperpolarizados (voltaje umbral -70 mV) y están caracterizados por una activación rápida, una inactivación transitoria y una conductancia relativamente baja. Además poseen una limitada sensibilidad a agentes que bloquean los canales de tipo L como son las dihidropiridinas. Tres miembros constituyen la familia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T, conocidos como  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  y  $\text{Ca}_v3.3$  (o también  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  y  $\alpha 1I$ ). Las corrientes de tipo T  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  se han encontrado en el sistema cardiovascular y aunque el  $\text{RNA}_m$  de  $\text{Ca}_v3.3$  ha sido detectado en células de músculo liso vascular, este isotipo es común a nivel cerebral (Pérez-Reyes et al., 1998). Así, se han encontrado corrientes T en las células musculares lisas de arterias coronarias (Ganitkevich e Isenberg, 1990), en la aorta (Akaike et al., 1989), la arteria mesentérica (Smirnov y Aaronson, 1992; Ohya et al., 1993; Gustafsson et al., 2001; Jensen et al., 2009), y de la arteria de la oreja del conejo (Benham et al., 1987), de cola de la rata (Wang et al., 1989; Petkov et al., 2001) y en las arteriolas cerebrales (Hirst et al., 1986) y a nivel del tejido eréctil en las células musculares lisas del cuerpo cavernoso humano (Zeng et al., 2005). Sin embargo, este tipo de corrientes no se han detectado en células musculares lisas frescas de arterias coronarias de conejo (Matsuda et al., 1990) o humanas (Quignard et al., 1997), sino en células en cultivo, las cuales mostraron ser dependientes de voltaje y poseer conductancia para el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  1:1 (Quignard et al., 1997). Además, las corrientes tipo T se han encontrado en células en proliferación y durante el crecimiento del cultivo, pero no en células confluentes (Akaike et al., 1989; Richard y Nargeot, 1998) ni en células frescas aisladas (Kuga et al., 1996). De

hecho, este tipo de corrientes se han encontrado en células en fase G0 o G1 del ciclo celular (Kuga et al., 1996) lo que sugiere que quizá tengan un papel importante durante la proliferación celular (Richard et al., 1998). Sin embargo, numerosos estudios los han implicado en la contractilidad vascular (Jensen et al., 2009) a través del endotelio vascular (Boulanger et al., 1994; Zhou y Wu, 2006; Figueroa et al., 2007).

A nivel del cuerpo cavernoso humano, Zeng y col. (2005) demostraron una interacción entre la vía del NO/GMP<sub>c</sub> y los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo T. Durante el descenso rápido de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> que tiene lugar durante la relajación inducida por el NO, éste además incrementa la expresión del RNAm de los canales Ca<sub>v</sub>3.1 retrasando por tanto la elevación de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, demostrándose así que dichos canales intervienen en el mantenimiento de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> y en la regulación de la contracción-relajación del músculo liso responsable de la erección/flacidez y del tono en el tejido eréctil.

Numerosos inhibidores de los canales tipo T han sido empleados en el tratamiento de enfermedades neurológicas (epilepsia, autismo, dolor) y cardiovasculares (antihipertensivos). La mayoría de los inhibidores de este tipo de canales no discrimina entre los canales tipo L y los tipo T y no muestran una selectividad suficiente, lo que los ha alejado de su uso clínico, sin embargo, recientemente se ha identificado un grupo de inhibidores más selectivo con un potencial terapéutico frente a enfermedades neurológicas (Yang et al., 2008; Belardetti y Zamponi, 2008).

### 3.2.2. Entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales activados por receptor (ROC)

El término ROC fue propuesto simultáneamente por Van Breemen (1978) y Bolton (1979) para definir cualquier canal de membrana cuya apertura está mediada por la unión de un agonista a su receptor independientemente de cambios en el potencial de membrana. En las células musculares lisas, diversos grupos han descrito que agonistas que abren este tipo de canales, los cuales poseen una elevada permeabilidad al Ca<sup>2+</sup>, median procesos de contracción y pueden producir una moderada despolarización celular o incluso nula (Karaki y Weiss, 1979; Meisheri et al., 1981). Los canales ROC han sido

descritos tanto en músculo liso visceral como vascular y son activados por una gran variedad de agonistas (acetilcolina, noradrenalina, endotelina, angiotensina II, serotonina, vasopresina y el neuropéptido Y). Con objeto de diferenciar este tipo de canales de los SOC, se admite que los canales ROC corresponden a canales de cationes (mono y divalentes) no selectivos, permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  y que se abren por la unión de un agonista a un receptor, al contrario de los SOC que lo hacen mediante agentes que o bien vacían los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  como la cafeína o mediante inhibidores de las bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) (tapsigargina, ácido ciclopiazónico) (González de la Fuente et al., 1995). Por otro lado, los canales ROC incluyen además los canales operados por ligando en los cuales el sitio de unión del ligando y el poro iónico están presentes en la misma proteína.

#### *3.2.2.1. Mecanismos de activación de los canales ROC*

En el caso en el que el receptor y el canal iónico están separados, existen diferentes rutas intracelulares que comprenden tanto la activación del receptor como la apertura de un canal de cationes no selectivo de acuerdo al tipo de receptor, de tejido y especie animal considerada. Este tipo de canales conducen iones atendiendo a un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática, son operativos bajo potenciales de membrana en reposo (aproximadamente -60 mV) e inhibidos por despolarización de la misma. En muchos de los casos de respuestas mediadas por canales ROC en el músculo liso, el receptor posee siete segmentos transmembrana y pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G. El mecanismo por el cual una proteína G activa una ruta de señalización intracelular asociada a un receptor de membrana que provoca la apertura de un canal iónico se ha demostrado tanto en el músculo liso visceral como vascular (Komori y Bolton, 1990; Vogalis y Sanders, 1990; Komori et al., 1992; Wang y Kotlikoff, 2000). En general, las proteínas G que están implicadas son las del subgrupo  $G_i/G_o$  en músculo visceral (Knot y Nelson, 1998; Komori et al., 1992; Wang y Kotlikoff, 2000) y  $G_q$  en músculo liso vascular (Macrez-Lepretre et al., 1997). La contribución exacta de los receptores acoplados a la PLC a los niveles globales

de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el acoplamiento excitación-contracción ha sido objeto de estudio. Se ha propuesto que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales ROC podría afectar a las corrientes de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) y/o activación de canales de  $\text{K}^+$  alterando el potencial de membrana y provocando así la posterior activación de los canales VOC, aceptándose así que el flujo de iones a través de los canales ROC participa en los cambios del potencial de membrana (Large, 2002).

Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico y sus metabolitos también activan canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor (Meves, 1994; Broad et al., 1999). Otras vías de señalización intracelular como la de la fosfolipasa  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) y la diacilglicerol lipasa también intervienen en dicha activación (Meves, 1994).

### 3.2.3. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por almacén (SOC)

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por almacén fue propuesta por Putney (1986) quien usó el termino de “entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa” para describir el fenómeno de acoplamiento entre la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el retículo sarcoplásmico y la activación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana en células no excitables. Así, el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  activa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales localizados en la membrana plasmática para rellenar los almacenes. A este tipo de canales se los ha denominado SOC (Putney, 1986) y a esta corriente se la ha denominado CRAC (canal de  $\text{Ca}^{2+}$  activado por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Hoth y Penner, 1992). Estudios previos ya habían examinado la relación entre la depleción de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo de la membrana (Casteels y Droogmans, 1981). Es importante señalar que es la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico *per se* y no el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado desde los depósitos la que activa a los SOC. Así, cualquiera que sea el estímulo por el cual la depleción tiene lugar (producción o no de  $\text{InsP}_3$ ), se activan corrientes SOC. Esto se ha demostrado experimentalmente mediante el uso de inhibidores de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico, tapsigargina y ácido ciclopiazónico (González de La Fuente et al., 1995). Dicha inhibición produce una depleción pasiva del retículo sarcoplásmico que activa a los SOC. Estos agentes son útiles para diferenciar

entre corrientes ROC y SOC porque, particularmente en el músculo liso, numerosos agonistas que activan a los canales ROC (ver apartado 3.2.2.1) activan a la PLC, la producción de fosfatidilinositoles y la subsiguiente liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico. Consecuentemente, el mismo agonista actuando sobre receptores de membrana puede activar tanto canales ROC como SOC. Sin embargo, mediante el uso de técnicas como “*quenching*” con *manganeso* y fura-2 (Byron y Taylor, 1995; Ohta et al., 1995) o la medida de flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (Xuan et al., 1992), se ha demostrado que los inhibidores de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico, incrementan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula muscular e inducen contracción, sin activar los receptores de membrana.

En la mayoría de los tipos celulares, incluyendo células hematopoyéticas, una de las corrientes dependientes de depósito mejor estudiadas es la  $I_{\text{CRAC}}$ , una corriente altamente permeable y selectiva al  $\text{Ca}^{2+}$ , que posee una marcada rectificación de entrada y cuya activación es independiente de cambios en el voltaje (Parekh y Putney, 2005; Montalvo et al., 2006).

#### 3.2.3.1. Mecanismos de activación de los SOC

Aunque la existencia de corrientes SOC ha sido caracterizada en diversos tejidos, el mecanismo de activación de estos canales sigue siendo objeto de debate. En los últimos años, se han propuesto modelos generales para la activación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa. En uno de los mecanismos interviene el denominado “factor de influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ ” o CIF. En éste modelo, el CIF que es liberado desde el retículo sarcoplásmico al citosol es el responsable directo de la activación de los SOC, aunque su naturaleza es desconocida (Putney, 2001).

En el modelo del “acoplamiento conformacional” se sugiere una interacción directa (proteína-proteína). Irvine (1990) fue el primero en describir el mecanismo de comunicación entre el retículo sarcoplásmico y la membrana plasmática implicando para ello una interacción directa proteína-proteína más que la propia difusión del ión a través de la membrana. Así, en este modelo, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico permite un cambio

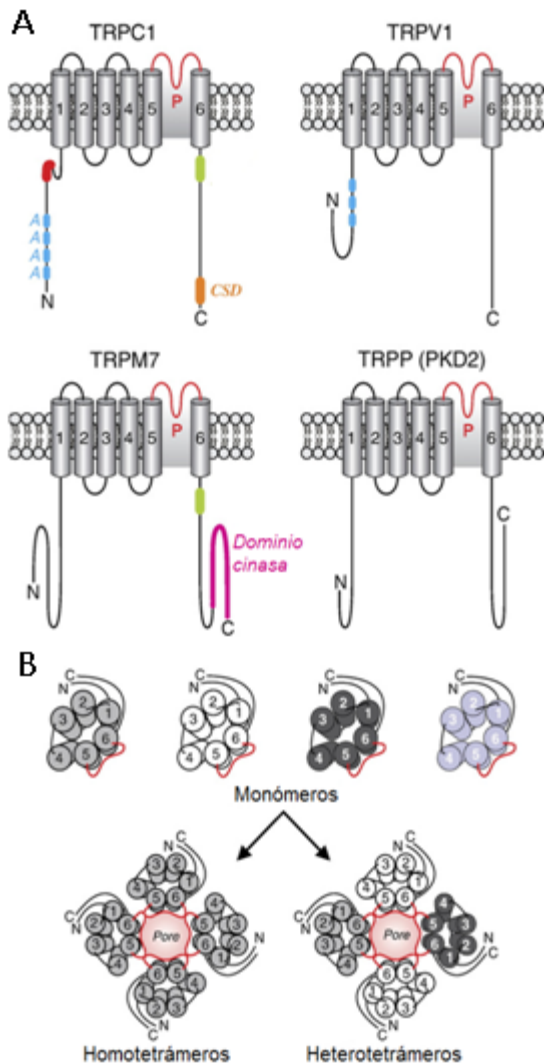
conformacional en el receptor de  $\text{InsP}_3$ , el cual está localizado en el retículo sarcoplásmico, siendo traslocado hacia los SOC localizados en la membrana plasmática; la interacción directa proteína-proteína es la que responde al nivel de llenado del retículo sarcoplásmico y transmite esta información directamente a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular (Ma et al., 2000).

En los modelos anteriores se asume que los SOC se encuentran en la membrana plasmática. Existe un tercer modelo en el que se asume que los canales se encuentran en vesículas citosólicas que se insertan en la membrana ante la depleción del retículo sarcoplásmico a través de un mecanismo de exocitosis (Holda y Blatter, 1997). Es el modelo de “fusión vesicular”, en el que la depleción de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  causa la fusión de vesículas que contienen canales SOC en la membrana plasmática permitiendo por tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular. Una alternativa a este modelo ha sido propuesta recientemente debido al descubrimiento de una nueva proteína transmembrana en *Drosophila* y linfocitos T humanos llamada molécula de interacción del estroma (STIM1) (del inglés, *stromal interacting molecule*) (Liou et al., 2005). STIM1 es el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  que se localiza en el almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Yeromin et al., 2004; Liou et al., 2005). Bajo la depleción de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , STIM1 migra desde el retículo sarcoplásmico a la membrana (Ong et al., 2007) donde puede tanto dimerizar con los SOC como ensamblarse a otras proteínas de membrana desconocidas para formar la unidad funcional de los SOC. En este modelo, la misma entidad molecular es la responsable del sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  del estado de llenado del retículo sarcoplásmico y de los SOC de la membrana plasmática (Zhang et al., 2005).

#### 3.2.4. Familia de los canales de *potencial de receptor transitorio* (TRP)

Si bien una gran cantidad de estudios han intentado establecer una conexión entre una determinada corriente y un determinado tipo de canal iónico, actualmente los mejores candidatos para los canales ROC y SOC y también para los canales activados por estiramiento (SAC) se corresponden

con las proteínas codificadas por los genes homólogos mamíferos de potencial de receptor transitorio (TRP) (Clapham, 2003). Se distinguen seis subfamilias de proteínas TRP de acuerdo a su activación y a la presencia de dominios



**Figura 4. Estructura de los canales TRP.** (A) Estructura representativa de los canales TRPC1, TRPV1, TRPM7 y TRPP. Constan de seis dominios transmembrana (1-6), repeticiones de ankirina (A), región que constituye el poro (P), dominio de unión a caveolina (C). (B) Reorganización de los monómeros TRP para formar canales funcionales (homo- o heterotetrámeros) que albergan al poro en la parte central del mismo. Modificado de Firth et al., 2007.

reguladores en sus extremos N- y C-terminal o secuencias de aminoácidos comunes. La familia de canales canónicos o TRPC es activada por receptores acoplados a proteínas G y receptores tirosina quinasa asociados a la hidrólisis de  $\text{PIP}_2$  vía PLC (Inoue et al., 2006).

El receptor vaniloide (TRPV) especialmente sensible a la capsaicina, es activado por los lípidos, los ácidos, el calor o la hipoosmolaridad se y encuentra en las terminaciones nerviosas de neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal, por lo que se piensa que participa en la termoalgesia (Vennekens et al., 2008). Los canales relacionados con la melastatina, subfamilia del canal del potencial transitorio TRPM son importantes porque se comportan como una proteína bifuncional, cuya diferencia estriba en ser un canal que además, posee actividad PLC o bien que puede ser activado en respuesta a incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , estrés oxidativo o la exposición al frío



(Pedersen et al., 2005). En lo que respecta al resto de las subfamilias, aunque no son ampliamente conocidas, se sabe que mutaciones en las mismas están asociadas a enfermedades genéticas e incluyen las poliquistinas (TRPP), la mucolidipinas (TRPML), anquirina (TRPA) y el mecanoreceptor C (TRPN) (Pedersen et al., 2005).

Desde el punto de vista estructural, todas las proteínas TRP son tetrámeros con una secuencia de seis dominios transmembrana, con un poro delimitado entre los dominios 5 y 6 cercano al extremo C-terminal el poro (Hofmann et al., 2002). Estos dominios transmembrana se encuentran altamente conservados a lo largo de la familia, existiendo una mayor variabilidad en los extremos N- y C-terminal intracelulares donde se encuentran diferentes dominios característicos de cada subfamilia (Figura 4). Por analogía con otros canales, los canales TRP se ensamblan en tetrámeros (al igual que los canales de  $K^+$  operados por voltaje) para formar la unidad funcional (Figura 4).

En la porción N-terminal suelen existir 3-4 repeticiones de anquirina en las familias TRPC, TRPV y TRPA y una secuencia de 33 aminoácidos capaz de interactuar con proteínas y otras dianas intracelulares. A diferencia de otros canales operados por voltaje ( $Ca^{2+}$  y  $K^+$ ), los canales TRP no poseen un sensor de voltaje, lo que hace que su actividad no dependa de cambios en el potencial de membrana. Los canales TRP además de ser independientes del voltaje, se comportan como canales no selectivos de cationes. Aunque muestran una gran diversidad en cuanto a las características de su permeabilidad a los iones, son permeables a los iones monovalentes como el  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Li^+$  y algunos de ellos son altamente selectivos para el  $Ca^{2+}$  (Owsianik et al., 2006).

#### *3.2.4.1. TRPC1, 2, 4 y 5*

Numerosos estudios han demostrado la contribución de los TRPC1 a la entrada de  $Ca^{2+}$  operada por almacén en varios tipos de vasos sanguíneos (Xu y Beech, 2001; Bergdahl et al., 2003; Bergdahl et al., 2005). La expresión heteróloga del TRPC1 humano ha demostrado que este tipo de canales pueden también formar SAC (Maroto et al., 2005). Existen diversas evidencias

a favor de que los TRPC1 constituye las subunidades que forman el poro de los SOC en los miocitos vasculares (Xu y Beech, 2001) y que poseen un papel importante en la regulación de los SOC en el músculo liso vascular. Se ha demostrado que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por almacén a través de canales TRP posee un papel importante en la contracción mediada por agonistas en arterias pulmonares (McDaniel et al., 2001). La expresión a la alta de los canales TRPC1 aumenta la vasoconstricción en la arteria pulmonar mediada por SOC (Kunichika et al., 2004). Parece que los canales TRPC1 son funcionales cuando forman complejos con otras isoformas de los TRPC y así dar lugar a heterotetrámeros. Los TRPC1 pueden asociarse a los TRPC4, TRPC5, TRPC3 y TRPP2 (Hofmann et al., 1999; Tsiokas et al., 1999; Strubing et al., 2001; Goel et al., 2002; Strubing et al., 2003). La asociación entre TRPC1 y 4 parece ser necesaria para la translocación de TRPC1 a la membrana plasmática y activar el mecanismo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por SOC en células HEK293 (Hofmann et al., 1999). TRPC1 y 5 forman heteromúltimeros funcionales con una conductancia próxima a la correspondiente para los canales SOC del músculo liso (Strubing et al., 2001). En arteriolas del conejo, anticuerpos frente TRPC5 bloquearon las corrientes SOC (Xu et al., 2006), mientras en el músculo liso del estómago su sobreexpresión mostró propiedades similares a los de tipo ROC (Lee et al., 2003) indicando que dichos canales poseen múltiples funciones dependiendo del tipo de músculo liso estudiado.

El papel de los TRPC2 no ha sido ampliamente estudiado, aunque parece que estos canales están relacionados también con la entrada capacitativa  $\text{Ca}^{2+}$  (Vannier et al., 1999; Gailly y Colson-Van Schoor, 2001). Mientras la isoforma TRPC4 está presente en el músculo liso, se expresa fundamentalmente en el endotelio donde posee un papel fundamental en la regulación de la permeabilidad vascular pulmonar (Tiruppathi et al., 2002), la vasorelajación mediada por agonistas (Freichel et al., 2001) y la transcripción génica (Fantozzi et al., 2003). Con respecto a los TRPC5 existe controversia en cuanto a su expresión en células musculares lisas o endoteliales de arterias pulmonares

(McDaniel et al., 2001; Sweeney et al., 2002) o incluso se ha mostrando la ausencia de su expresión en las mismas (Ng y Gurney, 2001).

#### 3.2.4.2. TRPC3, 6 y 7

Las isoformas TRPC3, 6 y 7 se consideran canales ROC debido a que son sensibles a diacilglicerol y a otros componentes de las rutas de señalización asociados a los receptores acoplados a proteínas G (Hofmann et al., 1999). Los canales TRPC6 son otra isoforma que se encuentra presente en la totalidad de la vasculatura, son permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  y son activados por la estimulación de receptores asociados a la ruta de la PLC (en concreto por el diacilglicerol y de manera dependiente de la PKC), por la depleción de los depósitos intracelulares y por el estrechamiento (Hofmann et al., 1999; Dietrich et al., 2005). Los canales TRPC6 son el componente esencial de las corrientes de cationes no selectivas activadas por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, y probablemente interviene en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  independientemente del vaciamiento de los depósitos intracelulares, lo que se ha descrito en la vena porta del conejo (Inoue et al., 2001). Y en la arteria mesentérica de la rata (Hill et al., 2006). Este canal interviene también en las corrientes de cationes no selectivas activadas por otros agonistas como la vasopresina en células A7r5 (Jung et al., 2002). La delección del gen que codifica para la proteína TRPC6 modificó tanto la activación de estos canales como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  asociada a través de los mismos. Por lo tanto, parece bastante probable que la proteína TRPC6 actúe como un componente esencial en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en los canales ROC en el músculo liso vascular. La activación del subtipo 6 en células vasculares musculares lisas contribuye a la despolarización de la membrana y a la subsiguiente activación de los canales VOC (Welsh et al., 2002; Soboloff et al., 2005). Debido a que los canales no selectivos de cationes, como es el caso de los TRPC6, conducen corrientes de sodio ( $\text{Na}^+$ ), pueden potencialmente despolarizar la membrana.

Existen numerosas evidencias que demuestran una interacción entre los canales TRPC6 y los TRPC3 o TRPC7 (Earley, 2006), lo que ayudaría a entender las discrepancias sobre la relación entre los canales ROC, SOC y

TRPC, que quizás sean explicables en base a la formación de heterómeros de los canales TRPC6 con otros TRPC. Por ejemplo, se ha descrito que la vasopresina activa una entrada ROC mediante la asociación de las isoformas 6 y 7 en la línea celular A7r5 (Maruyama et al., 2006). Alternativamente, también se ha demostrado que la inactivación de los canales TRPC6 mediante el empleo de un oligonucleótido antisentido abolió el incremento de la entrada capacitativa inducida por el ácido ciclopiazónico asociada a la estimulación con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en las células musculares de la arteria pulmonar de la rata (Yu et al., 2003). Por otra parte, anticuerpos frente los TRPC6 inhibieron las corrientes SOC en la arteria coronaria (Saleh et al., 2008).

Además de la isoforma 6, otros TRPC han sido implicados en la vasoconstricción inducida por agonistas. Recientemente, oligonucleótidos antisentido contra el RNAm del TRPC3, suprimieron las corrientes activadas por uridina 5'-trifosfato (UTP) en células de músculo liso arterial y la vasoconstricción en arterias cerebrales (Reading et al., 2005). Así, debido a que el UTP actúa a través de receptores purinérgicos, el TRPC3 puede ser asociado a un canal ROC en las arterias cerebrales. Sin embargo, en miocitos pulmonares humanos, el TRPC3 ha sido implicado tanto como canal ROC como canal SOC (White et al., 2006).

La isoforma TRPC7 no ha sido estudiada profundamente en el tejido vascular, pero diversos estudios mediante técnicas inmunocitoquímicas la han localizado en células endoteliales de arterias coronarias y cerebrales (Yip et al., 2004) y en células musculares lisas de aorta y renales (Walker et al., 2001; Facemire et al., 2004) y ha sido caracterizado como un canal no selectivo de cationes activado por diacilglicerol que contribuye a la formación de los canales ROC y también de los SOC. Así, se ha demostrado que la endotelina-1 activa un canal de catión permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  con TRPC7, posiblemente asociado a TRPC3 en miocitos de la arteria coronaria del conejo (Peppiatt-Wildman et al., 2007) y la expresión a la alta de la isoforma 7 en células HEK293 reveló la presencia de actividad SOC (Riccio et al., 2002).

#### 3.2.4.3. Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ activada por el estiramiento

La elevación de la presión intravascular causa despolarización y contracción (tono miogénico) de las pequeñas arterias y arteriolas, siendo esta respuesta un elemento clave en la regulación del flujo sanguíneo. Esta respuesta requiere la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  vía canales VOC secundaria a la despolarización celular. Cómo los cambios en la presión intraluminal están asociados a cambios en el potencial de membrana hace que se haya propuesto a los canales TRPC como candidatos en este proceso. Recientemente, se ha propuesto que los canales TRPC6 y TRPM4 tiene un papel importante en el control del tono miogénico a nivel cerebral contribuyendo a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y vasoconstricción inducida por estiramiento. Welsh y col. (2002) demostraron que en arterias cerebrales presurizadas de la rata, la eliminación de la expresión de la proteína TRPC6 atenuaba la vasoconstricción inducida por la presión (o tono miogénico) y la despolarización asociada, la cual activa en segunda instancia la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje. Ésta y otras observaciones hacen que los canales TRPC6 tomen importancia como canales de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a cambios mecánicos, que son activados mediante la vía de la  $\text{PLC}\beta$ /diacilglicerol para controlar el tono miogénico debido a su capacidad para despolarizar la membrana de las células musculares lisas vasculares y aumentar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales VOC. En células HEK293 y CHO el péptido GsMTx-4, aislado del veneno de la tarántula, bloqueó la activación de los canales TPRC6 inducida por estiramiento, confirmando que estos canales y los canales activados por estrechamiento son la misma entidad molecular (Spasova et al., 2006). En experimentos *in vivo*, la supresión de los canales TRPM4 demostró que estos canales contribuyen mayormente a la regulación del tono miogénico y del flujo sanguíneo a nivel cerebral (Reading y Brayden, 2007). Por otra parte, se ha demostrado que el ácido 20-hidroxieicosatetraenoico (20-HETE), un potente vasoconstrictor lipídico liberado de las células endoteliales por incrementos de la presión intravascular, activa directamente los canales TRPC6 (Basora et al., 2003) y los TRPV1 (Scotland et al., 2004), siendo este mecanismo de vasoconstricción, un mecanismo adicional a la activación inducida por presión

de estos canales y mostrando tener un papel importante a nivel de la regulación de procesos como la presión arterial. Aunque otros miembros de la familia TRP, como los TRPC1 (Maroto et al., 2005), TRPV2 (Muraki et al., 2003) y TRPA1 (Corey et al., 2004) pueden ser activados también mecánicamente, su implicación en la regulación del tono miogénico está todavía sin determinar.

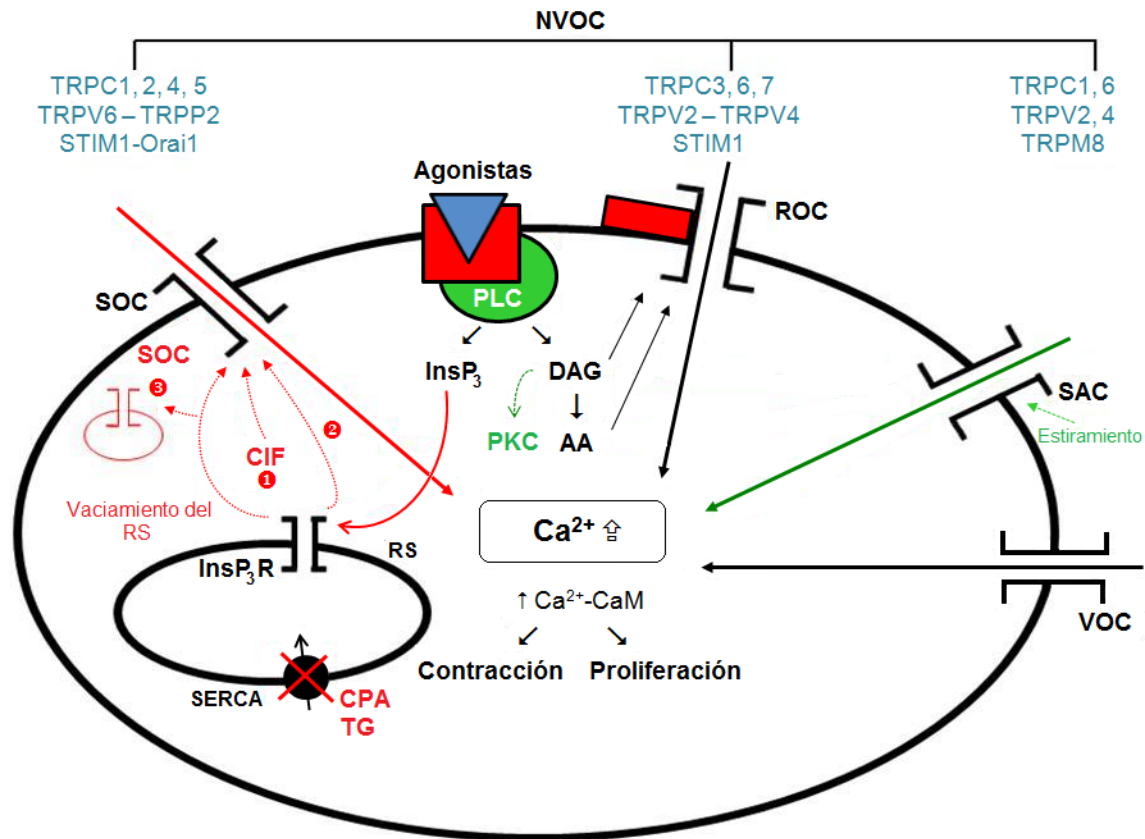
### 3.2.5. Identificación y papel de las proteínas STIM1 y Orai1

La identificación de la naturaleza molecular de los SOC ha llevado a intensificar el estudio de los miembros de la familia de canales TRP. Sin embargo, las propiedades del poro iónico de la mayoría de los canales TRP, incluyendo los TRPV6 y TRPV5, no parecen corresponder con las propiedades del poro de los canales CRAC (Owsianik et al., 2006). Pero volviendo a que una o más proteínas TRP participen en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por almacén, el estudio se ha centrado en nuevos componentes que quizás jueguen un papel importante en este campo, las proteínas STIM1 (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005; Zhang et al., 2005; Spassova et al., 2006) y la proteína Orai1 o CRACM1 (Feske et al., 2006; Yeromin et al., 2006; Prakriya et al., 2006), las cuales parecen ser componentes esenciales de y reguladores de los SOC/CRAC.

Las proteínas STIM fueron identificadas y estudiadas varios años antes de que fueran relacionadas con la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$ . La proteína STIM1 fue reconocida originalmente y denominada molécula de interacción del estroma a partir del estudio de proteínas que se expresaban en la superficie de las células del estroma (Oritani y Kincade, 1996). Esta proteína que se localiza en la membrana plasmática, fue identificada como un tipo de proteínas de membrana que interaccionaba y alteraba tanto la supervivencia como la proliferación de linfocitos B (Oritani y Kincade, 1996) y que se regula por fosforilación, además, posee sitios de glucosilación en su extremo N-terminal (Parker et al., 1996; Dziadek y Johnstone, 2007). Como consecuencia del extenso estudio de STIM1, se identificó STIM2, de estructura muy similar a STIM1, que se expresa solo intracelularmente (Soboloff et al., 2006), mientras

que STIM1 se expresa en la superficie celular y en el retículo sarcoplásmico. En células con los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  repletos, STIM1 parece estar distribuida de manera endógena a lo largo del retículo sarcoplásmico de acuerdo con su función de sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Recientemente se ha demostrado que la presencia de STIM1 en la membrana plasmática posee un papel funcional y se ha sugerido que se transloca a la membrana en respuesta al vaciamiento de los depósitos intracelulares (Zhang et al., 2005). Así, STIM1 posee un papel dual, por una parte actuando como un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico y como un transductor de información a los SOC de la membrana. La depleción de los depósitos causa una rápida translocación y agrupamiento de moléculas de STIM1, movimiento que precede a la activación de los canales CRAC (Wu et al., 2006). Además, el llenado de los depósitos intracelulares provoca una redistribución de las proteínas STIM1 a lo largo del retículo sarcoplásmico (Liou et al., 2005). El proceso de agregación y aproximación a la membrana es un fenómeno totalmente reversible, hecho que refuerza la teoría que la activación del canal resulta de una interacción reversible entre el retículo sarcoplásmico y la membrana, opuesto a la fusión o inserción entre ambos. Independientemente del vaciamiento de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ , STIM2 se colocaliza y bloquea la función de STIM1. Así, mientras STIM1 es un mediador que se requiere para la activación de los SOC, STIM2 es un potente inhibidor de este proceso y por lo tanto un regulador de la vía de señalización operada por almacén (Soboloff et al., 2006). Se ha propuesto que la misma proteína STIM1 constituye parte de los canales ROC. Por ejemplo, en células HEK, las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a ácido araquidónico dependen de la presencia de STIM1 en la membrana. A diferencia de los SOC, la implicación de STIM1 en los canales ROC no implica la migración de la proteína desde el retículo sarcoplásmico a la membrana (Mignen et al., 2007). La proteína STIM1 puede interaccionar y causar la activación de los canales TRPC1 sugiriendo que esta proteína es un componente esencial para la regulación de la contractilidad vascular asociada con los procesos SOC o entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa (López et al., 2006). A la identificación de STIM1 como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , ha seguido la elucidación de la

subunidad formadora del poro, Orai1/CRACM1, una proteína de cuatro segmentos transmembrana que forma los canales de membrana. La co-expresión de STIM1 y Orai1 da lugar a corrientes CRAC, mientras que su expresión individual o no la incrementa significativamente o la reduce (Peinelt et al., 2006; Yeromin et al., 2006).



**Figura 5. Mecanismos de activación de los ROC, SOC y SAC.** El  $Ca^{2+}$  extracelular accede al interior celular a través de canales operados por voltaje (VOC) o por canales no VOC (NVOC). Los NVOC incluyen a los canales de  $Ca^{2+}$  operados por receptor (ROC), a los canales de  $Ca^{2+}$  operados por almacén (SOC) y a los canales de  $Ca^{2+}$  activados por estiramiento (SAC). El complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina ( $Ca^{2+}$ -CaM) activa tanto la contracción como la proliferación celular. La naturaleza molecular de los NVOC descritos para los SOC en el músculo liso corresponde a los TRPC1, 2, 4, 5, TRPV6, TRPP2, STIM1 y Orai1; TRPC3, 6, 7, TRPV2, 4 y STIM1 para los ROC. Y los TRPC1, 6, TRPV2, 4 para los SAC. El vaciamiento del retículo sarcoplásmico (RS) puede ser mediado por agentes como el ácido ciclopiazónico (CPA) y la tapsigargina (TG), los cuales inhiben la bomba  $Ca^{2+}$ -ATPasa (SERCA) del retículo RS. Los mecanismos de activación de los SOC están representados en líneas discontinuas (ver texto). El diacilglicerol (DAG) y el ácido araquidónico (AA) también participan en la activación de los ROC. Inositol trifosfato ( $InsP_3$ ). Receptor de Inositol trifosfato ( $InsP_3R$ ). Modificado de Guibert et al., 2008.



### 3.3. Implicación del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en la vasoconstricción arterial

El almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en las organelas celulares está sujeto no sólo a una importante regulación fisiológica, sino también a una intervención en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la señalización celular. El principal compartimento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células musculares lisas se localiza en el retículo sarcoplásmico; esta organela tiene un papel importante en el mantenimiento de bajos niveles de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  citoplasmático. Su volumen varía entre los diferentes tipos de músculo liso, pero en general se estima que supone un 1.5 – 7.5 % del total del volumen celular. Particularmente es más abundante en músculos de contracción tónica (como la arteria aorta) que en los de contracción fásica (como la vena porta). En gran medida, el retículo sarcoplásmico está asociado con la membrana plasmática, de manera que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  puede influenciar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  cercana a la superficie interna de la membrana plasmática. Esta organización juega un papel esencial en la señalización intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  (Sanders, 2001).

#### 3.3.1. Mecanismos de liberación de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

##### 3.3.1.1. Inositol trifosfato ( $\text{InsP}_3$ )

En respuesta a una variedad de estímulos (neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento) las diferentes isoformas de la enzima PLC catalizan la hidrólisis de un precursor localizado en la membrana plasmática, el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) para dar lugar a  $\text{InsP}_3$  y diacilglicerol. Esta vía de señalización puede ser activada de diferentes maneras: por receptores acoplados a proteínas G (vía  $\text{PLC}\beta$ ), por receptores acoplados a la activación de tirosina quinasas ( $\text{PLC}\gamma$ ), por incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\text{PLC}\delta$ ) o por la proteína Ras ( $\text{PLC}\epsilon$ ) (Rebecchi et al., 2000; Litjens et al., 2007).

Los receptores de  $\text{InsP}_3$  ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) están constituidos por cuatro subunidades. Cada subunidad tiene ~260 kDa y seis segmentos transmembrana, con los típicos dominios localizados en el extremo C-terminal, que anclan la proteína a la membrana y albergan el poro y un dominio N-terminal que queda libre en el citoplasma y que posee en su parte final la

región de unión a  $\text{InsP}_3$  (Berridge, 1993; Joseph et al., 1995; Michikawa et al., 1994). Existen tres isoformas de los  $\text{InsP}_3\text{R}$  ( $\text{InsP}_3\text{R1}$ ,  $\text{InsP}_3\text{R2}$  e  $\text{InsP}_3\text{R3}$ ) las cuales difieren en su afinidad por el  $\text{InsP}_3$ , su regulación (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y ATP) y su modulación por proteínas asociadas como FK506 (Ross et al., 1992; Wojcikiewicz, 1995; De Smedt et al., 1997).

La reorganización estructural de los receptores contribuye a su actividad. Los  $\text{InsP}_3\text{R}$  forman agregados de 25-35 receptores (de ~800 nm de diámetro) con unas micras de separación entre ellos (Shuai et al., 2006). La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde uno de los agregados genera un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , denominado ráfaga de  $\text{Ca}^{2+}$  (" $\text{Ca}^{2+}$  puff") (Parker y Yao, 1991), mientras la procedente de varios agregados genera una elevación global  $\text{Ca}^{2+}$  como una "oscilación" u onda de  $\text{Ca}^{2+}$  (Parker y Yao, 1991).

Para la apertura del canal se requiere tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  como el  $\text{InsP}_3$ , pues solamente el  $\text{Ca}^{2+}$  es insuficiente para provocar la activación del  $\text{InsP}_3\text{R}$  (Iino et al., 1990; Finch et al., 1991; Dufour et al., 1997; Mak et al., 1998). Se han encontrado números sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  en los  $\text{InsP}_3\text{R}$  (Miyakawa et al., 2001). El  $\text{Ca}^{2+}$  regula la actividad del canal de una manera bifásica, dependiendo de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ : ante bajas  $[\text{Ca}^{2+}]$  el ión ejerce un papel activador, mientras que a las altas es inhibitorio, existiendo así un mecanismo de retroalimentación durante la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Iino y Endo, 1992; Mak et al., 2001). También se ha descrito que el propio contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico regula la apertura del canal (regulación luminal de los  $\text{InsP}_3\text{R}$ ): en hepatocitos permeabilizados, se ha demostrado que un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  aumenta la sensibilidad de los  $\text{InsP}_3\text{R}$  por su ligando, lo que promueve una liberación espontánea de  $\text{Ca}^{2+}$  (Missiaen et al., 1992; Nunn y Taylor, 1992). Por ejemplo, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por  $\text{InsP}_3$  resulta abolida cuando el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico disminuye por debajo del 80% de su contenido normal, lo que se ha demostrado en células musculares del útero (Shmygol y Wray, 2005). En este contexto, quizás tengan cabida dos explicaciones en la regulación luminal de los  $\text{InsP}_3\text{R}$ : el  $\text{Ca}^{2+}$  regula la liberación por unión a los  $\text{InsP}_3\text{R}$  (1) en el lumen del retículo sarcoplásmico o (2) en la parte citoplasmática del canal cuando el ión es liberado desde el retículo

sarcoplásmico y activa el mecanismo de proceso de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR). También se ha propuesto que la CaM se requiere para la activación de dichos receptores (Kasri et al., 2006). Otros ligandos fisiológicos como el ATP, modulan la sensibilidad del canal por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Smith et al., 1986). Al igual que el  $\text{Ca}^{2+}$ , esta activación es bifásica: a concentraciones micromolares, el ATP ejerce una acción estimuladora, mientras que la inhibición de su apertura se produce en el rango de concentraciones milimolares (Iino et al., 1991; Bezprozvanny y Ehrlich, 1993).

#### 3.3.1.2. Receptor de rianodina (RyR): entrada de $\text{Ca}^{2+}$ inducida por $\text{Ca}^{2+}$

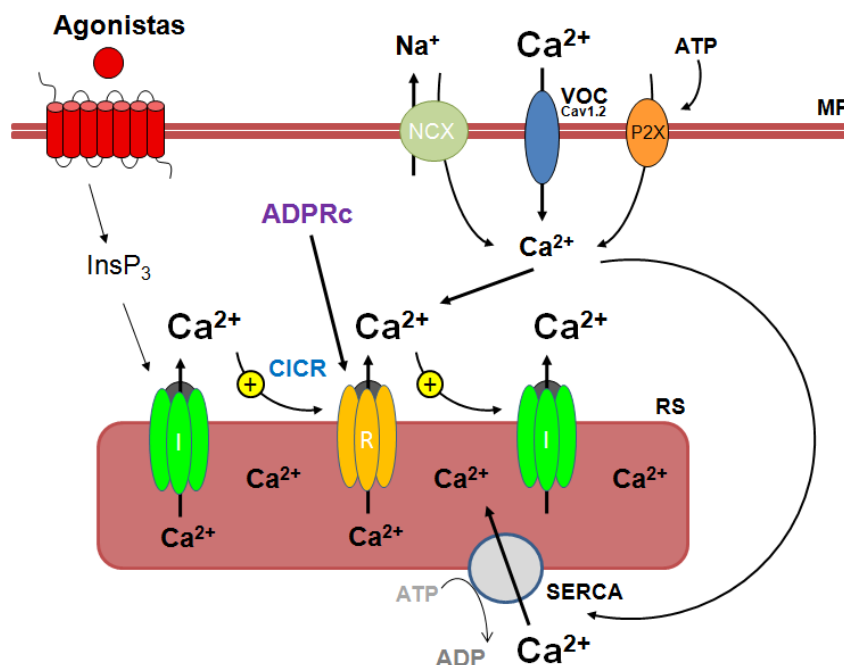
Otra vía de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares es la unión del alcaloide rianodina a sus receptores RyR localizados en el retículo sarcoplásmico. Su receptor presenta homologías funcionales y estructurales con el receptor de  $\text{InsP}_3$ . El RyR se presenta en forma de tetrámero, con el extremo C-terminal formando el poro y un largo extremo N-terminal que se proyecta hacia el citosol (Coussin et al., 2000). Tres isoformas del RyR han sido clonadas (RyR1-RyR3) cada una de ellas con diferente distribución tisular (Zorzato et al., 1990). RyR1 es la principal isoforma en el músculo esquelético, RyR2 es la predominante en el corazón, mientras que las tres isoformas han sido localizadas en el músculo liso (Neylon et al., 1995; Coussin et al., 2000). Las bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (nanomolares) constituyen el principal activador de los RyR en el músculo liso durante el proceso de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Iino et al., 1990; Herrmann-Frank et al., 1991; Zhou et al., 2004; Zoghbi et al., 2004; Zahradnik et al., 2005) mientras que concentraciones mayores (> micromolar) provocan el cierre. Al igual que la rianodina, la cafeína también puede abrir el canal (Berridge, 1993).

De manera general se acepta que la estimulación de receptores acoplados a proteínas G por parte de diferentes agonistas (endotelina, angiotensina II, serotonina, noradrenalina, acetilcolina), la formación de  $\text{InsP}_3$ , y la activación de  $\text{InsP}_3\text{R}$  causan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Berridge, 1993) (Figura 6). Esta señal de  $\text{Ca}^{2+}$  se amplifica por la activación de los RyR debido a la elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dando lugar al denominado CICR.

En este proceso, algunos de los mecanismos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales varían en función de los celulares, son todavía objeto de estudio. Algunos de los principales son el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) funcionando en su modo "reverso" (Lee et al., 2001; Dai et al., 2006), los receptores P2X sensibles a ATP (Lamont y Wier, 2002) o los canales  $\text{Ca}_v1.2$  los cuales pueden activar al RyR y provocar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico como sucede en los cardiomiocitos (Wang et al., 2001) o simplemente proporcionar la recarga del retículo sarcoplásmico sin interaccionar directamente con el RyR (Essin et al., 2007). Otros mecanismos serían los que implican a algunas isoformas de los TRP, como son los TRPC3 y TRPC7 (Peppiatt-Wildman et al., 2007) y los miembros de la familia  $\text{Ca}_v3$  de los canales tipo T, los cuales han sido también implicados en los mecanismos de entrada (Perez y Sanderson, 2005).

Una segunda vía de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está desencadenado por la ADP-ribosa cíclica (ADPRc), un nucleótido de adenina sintetizado a partir del dinucleótido adenina nicotinamida (NAD) por la enzima ADPR ciclasa (Lee, 1994; Galione y White, 1994; Lee, 1997; Galione y Churchill, 2002). El ADPRc actúa como segundo mensajero y contribuye a la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  al incrementar la sensibilidad del RyR por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Dousa et al., 1996; Lee, 1997) (Figura 6). Se ha demostrado la presencia de actividad ADP-ribosil ciclasa en la aorta (De Toledo et al., 2000), arterias coronarias (Kannan et al., 1996; Yu et al., 2000; Zhang et al., 2004), pulmonares (Evans y Dipp et al., 2002) y renales (Li et al., 2000), así como que el estrés oxidativo incrementa la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células musculares lisas obtenidas de arterias coronarias a través de una vía que implica a la ADPRc (Zhang et al., 2004) y que el NO inhibe a la ADPRc en este mismo tipo celular (Yu et al., 2000). Un tercer mecanismo implica al ácido nicotínico fosfato adenina dinucleótido (NAADP), otro segundo mensajero sintetizado por la ADPR ciclasa que controla la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los lisosomas a través de los RyR (Yusufi et al., 2001; Galione y Churchill, 2002; Gerasimenko et al., 2003) y que también participa en la elevación del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta a agonistas acoplados a proteínas G, como se ha demostrado en la circulación renal (Tiffany et al., 2009).

Algunos de los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado del retículo sarcoplásmico es por un lado la estimulación de canales de  $\text{K}^+$ , como los BK y los SK, lo que conlleva la hiperpolarización de la membrana. En concreto la apertura de los BK resulta del  $\text{Ca}^{2+}$  procedente de la activación del RyR. Y por otra parte los canales de cloro sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  (Liu y Farley, 1996; Haddock y Hill, 2002), cuya estimulación produce despolarización de la membrana y posterior activación de los canales  $\text{Ca}_v1.2$ . La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  completa el ciclo de alimentación positiva junto con la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico, que introduce  $\text{Ca}^{2+}$  de nuevo al interior del retículo sarcoplásmico, y las bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas de membrana que liberan  $\text{Ca}^{2+}$  al exterior celular.



**Figura 6. Mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.** La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) activada por el inositol trifosfato ( $\text{InsP}_3$ ) en respuesta a la activación de receptores acoplados a proteína G. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se puede realizar a través de canales operados por voltaje (VOC), receptores P2X activados por ATP o por la actuación de la bomba  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en funcionando en modo "reverso". El  $\text{Ca}^{2+}$  que accede al interior celular a través de los canales VOC puede directamente acceder al RS a través de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del RS (SERCA). La ADP-ribosa cíclica (ADPRc) actúa como segundo mensajero y contribuye a la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  incrementando la sensibilidad del RyR por el  $\text{Ca}^{2+}$ . I (receptor de  $\text{InsP}_3$ ). R (receptor de rianodina). Membrana plasmática (MP). Retículo sarcoplásmico (RS).

### 3.3.1.3. Regulación mitocondrial de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

La estrecha disposición espacial entre la mitocondria y el retículo sarcoplásmico (Rizzuto et al., 1998; Csordas et al., 2006), hacen de esta organela un importante mediador en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La mitocondria, además de producir ATP de manera aeróbica, almacena y libera  $\text{Ca}^{2+}$ . La membrana mitocondrial externa posee un papel crítico en la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rapizzi et al., 2002; Csordas et al., 2002) a través de los canales de aniones dependientes de voltaje (VDAC) (Shoshan-Barmatz y Gincel, 2003). Los VDAC son canales que permanecen abiertos a potenciales  $\sim 30$  mV, pero que aumentan su selectividad por los cationes ante potenciales altos: se dice que bajo estas condiciones que los canales se encuentran en un “estado cerrado” (Báthori et al., 2006). Durante el estado de modo cerrado, cationes como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  permean a lo largo del canal (con baja permeabilidad a los aniones) (Tan y Colombini, 2007).

Debido a las características de los mismos, las altas  $[\text{Ca}^{2+}]$  generadas tras la apertura de los  $\text{InsP}_3\text{R}$  podría dificultar la transferencia iónica. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que interacción molecular entre los VDAC y los  $\text{InsP}_3\text{R}$  tiene lugar a través de la chaperona gp75 (Szabadkai et al., 2006), permitiendo la regulación positiva de la captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rapizzi et al., 2002). Sigma1 y BiP, chaperonas del retículo sarcoplásmico, median la estabilización de los  $\text{InsP}_3\text{R}$  mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Hayashi y Su, 2007). A nivel de la membrana interna, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de la mitocondria tiene lugar a través de un uniportador; un canal (rectificador de entrada) selectivo para el  $\text{Ca}^{2+}$  y cuya actividad no está acoplada a la hidrólisis de ATP ni al movimiento de otros iones, sino que utiliza la diferencia de potencial mitocondrial (Becker et al., 1980; Nicholls y Crompton, 1980; Kirichok et al., 2004). Por otro lado, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  sucede a través de un antiportador de  $\text{Na}^+$  o protones ( $\text{H}^+$ ) (Rottenberg y Marbach, 1990).

Al igual que los  $\text{InsP}_3\text{R}$ , los RyR también pueden ser modulados por la mitocondria. Esta organela parece que actúa tamponando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico liberado vía RyR reduciendo tanto la frecuencia como la amplitud de los “picos” (Pacher et al., 2002).

## 4. SENSIBILIZACIÓN AL $\text{Ca}^{2+}$

### 4.1. Definición y mecanismos de activación

La importancia de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) en la contracción del músculo liso en un mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$  está bien documentada. Anteriormente se pensaba que la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) no estaba regulada y por tanto se encontraba permanentemente activa (Brozovich, 2003). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que la contracción en el músculo liso es dependiente también de otro mecanismo en el que juega un papel importante la actividad de la MLCP. Así, la inhibición de la actividad de ésta provoca un incremento en la fuerza ante concentraciones constantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras la estimulación de la actividad fosfatasa reduce la fuerza en las mismas condiciones, dando lugar a los fenómenos conocido como “sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ ” y “desensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ ” de la célula muscular lisa en los que están implicadas las quinasa Rho y/o PKC, aunque tradicionalmente la activación de la vía RhoA/RhoK es mecanismo más aceptado (Somlyo y Somlyo, 2003). En el músculo liso, la estimulación con agonistas puede dividirse en dos fases: una fase inicial rápida con un incremento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y de la fosforilación de la  $\text{MLC}_{20}$ , y una segunda fase caracterizada por un incremento sostenido de la fuerza de contracción a pesar de los bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y fosforilación de la  $\text{MLC}_{20}$ , mantenida por la activación de Rho y la inactivación de la MLCP (Swärd et al., 2000).

La MLCP aislada en el músculo liso consta de tres subunidades: una subunidad catalítica de 38-kDa que posee actividad fosfatasa (PP1), una subunidad de unión a miosina (MYPT1) de 110-133 kDa y una tercera de 20-kDa de función desconocida (M20). Cuando la subunidad MYPT1 se encuentra fosforilada, se inhibe la actividad catalítica de la MLCP, incrementándose la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  del aparato contráctil para una  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dada. Además, en el músculo liso se expresa un inhibidor selectivo de la MLCP, la proteína de 17 kD inhibidora de proteína fosfatasa (PP1) potenciada por la PKC (CPI-17); cuando éste es fosforilado por la PKC, CPI-17 se convierte en un potente inhibidor de

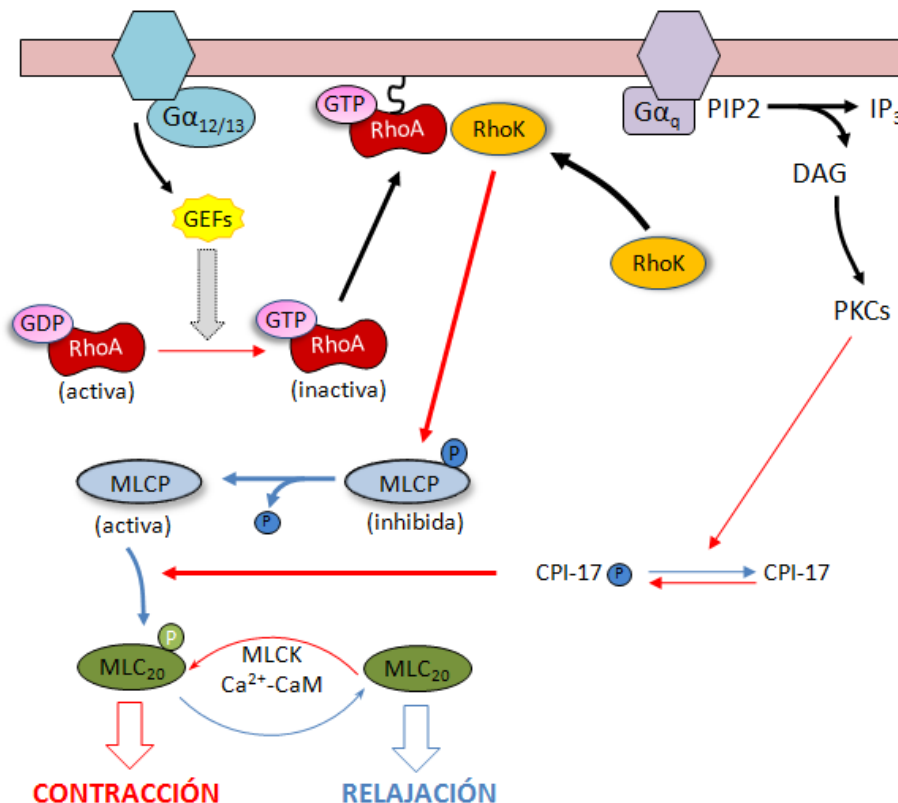
Ser/Thr fosfatasa, tales como la miosina fosfatasa PP1 (Brozovich, 2002) (Figura 7).

Numerosos agonistas mediante su interacción con receptores acoplados a proteínas G ( $G_{\alpha_q}$ ) pueden inducir sensibilización al  $Ca^{2+}$  a través de RhoA y otros efectores. RhoA, es una proteína G de bajo peso molecular perteneciente a la superfamilia Ras (Bishop y Hall, 2000). Al igual que otras GTPasas, en su estado inactivo se encuentra en el citosol unida a GDP y a su inhibidor (RhoGDI), la cola hidrofóbica de geranilo que posee RhoA interacciona con una zona hidrofóbica del inhibidor RhoGDI manteniendo y reforzando la interacción proteína-proteína entre el extremo N-terminal del inhibidor y una zona altamente conservada de la proteína RhoA (Somlyo y Somlyo, 2000; Somlyo y Somlyo, 2003). La activación de receptores acoplados a proteínas G ( $G_q$ ) y de receptores de la familia de tirosina quinasa, permiten activar los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (RhoGEFs), los cuales intercambian GDP por GTP en la proteína RhoA. Así, RhoGDI se disocia de RhoA-GTP y se transloca a la membrana donde interacciona con la RhoK, que a su vez fosforila a la subunidad MYPT1 de la MLCP e impide su actividad (Somlyo y Somlyo, 2002). Las RhoGAPs son unas proteínas con actividad GTPasa que catalizan la hidrólisis de la molécula de GTP que se halla unido a RhoA para dar lugar a RhoA-GDP que vuelve a asociarse con RhoAGDI y retorna así a su estado inactivo (Somlyo y Somlyo, 2002).

Por otro lado, en contra de lo aceptado generalmente, recientemente se ha establecido el concepto de “sensibilización al  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$ ” en el músculo liso vascular. Así, la despolarización de la membrana no solamente permite el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la subsiguiente activación de la MLCK sin alterar otros procesos a nivel intracelular, sino que también activa la quinasa Rho permitiendo la inhibición de la MLCP y el proceso de sensibilización al  $Ca^{2+}$  de la maquinaria contráctil. Así, durante la despolarización celular, la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana origina la activación de RhoK y la fosforilación de la subunidad de MYPT1 de la MLCP en el residuo Thr695 inhibiendo así su actividad, lo que provoca un incremento en la fosforilación de la  $MLC_{20}$  y en la fuerza (Mita et al., 2002; Sakurada et al., 2003).



Por otra parte, la vía RhoA/RhoK posee un papel en el endotelio vascular regulando negativamente la fosforilación de la enzima eNOS a nivel del residuo Ser1177 a través de la inhibición de la proteína quinasa B (PKB o Akt), y regulando a la baja la expresión de la eNOS de forma independiente de la PKB (Ming et al., 2002). Por tanto, el sistema RhoA/RhoK inhibe la producción de NO endotelial (Ming et al., 2002; Shiga et al., 2005).



**Figura 7. Regulación de la miosina por la vía RhoA/RhoK.** Las flechas rojas indican las vías que activan a la miosina y conducen a la contracción muscular. Las azules reducen la actividad de la miosina. Diferentes agonistas actúan sobre sus receptores asociados a proteínas G e inician la cascada ilustrada en el esquema de eventos intracelulares que inhibe a la miosina fosfatasa (MLCP), incrementa la actividad de la miosina mediante la fosforilación en el residuo Ser-19 (MLC<sub>20</sub>) y promueve la contracción muscular. PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato). IP<sub>3</sub> (Inositol trifosfato). DAG (diacilglicerol). PKC (proteína quinasa C). RhoK (Rho quinasa). CPI-17 (proteína de 17 kD inhibidora de proteína fosfatasa 1 (PP1) potenciada por la PKC). MLCK (quinasa de las cadenas ligeras de la miosina). GEF (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina).

#### 4.2. Papel de la RhoK en la regulación de la contracción del tejido eréctil

Recientemente se ha descrito que la inhibición selectiva de RhoK produce un incremento marcado de la presión intracavernosa y erección por un

mecanismo independiente del NO, sin afectar de forma significativa la presión arterial (Chitaley et al., 2001), por lo que el antagonismo de la RhoK introduce una alternativa terapéutica potencial para el tratamiento de la disfunción eréctil. La actividad fisiológica tónica de la RhoA/RhoK parece regular la función eréctil y el mantenimiento del estado de flacidez (contráctil) del pene: la inhibición de esta enzima produce erección y la transfección genética adenovírica de la forma dominante negativa de la proteína Rho incrementa la función eréctil (Chitaley et al., 2002).

La implicación del complejo RhoA/RhoK en la vasoconstricción inducida por la endotelina-1 y agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos ha sido demostrada en el tejido eréctil peneano (Mills et al., 2001a; Wingard et al., 2001). Cuando la endotelina-1 o metoxamina fueron inyectadas en el tejido eréctil, la magnitud de la erección fue significativamente reducida, lo que demuestra las acciones vasoconstrictoras de estos agentes comparadas con la administración anterior de los mismos (controles). Sin embargo, el tratamiento con Y-27632 previo a la administración de endotelina-1 y metoxamina impidió los efectos vasoconstrictores de ambos. Se piensa que este derivado de piridina ocupa el sitio de unión del ATP en la RhoK y así evita la fosforilación de la MLCP; de este modo, la MLCP no fosforilada sería activa para escindir el grupo fosfato de alta energía desde la MLCK hasta el ADP, promoviendo relajación muscular. Así, se confirma la importancia de la vía de señalización RhoA/RhoK en el mantenimiento del estado de flacidez del pene (Mills, 2002).

Los estudios *in vitro* del grupo de Somlyo (Wang et al., 2002), han demostrado que en el músculo liso del cuerpo cavernoso el sistema RhoA/RhoK participa en los procesos de *sensibilización al  $Ca^{2+}$*  de la célula muscular, contribuyendo así de manera importante a la contracción.

Además, parece ser que el sistema RhoA/RhoK modula la función eréctil *in vivo* en parte reduciendo el contenido y la actividad de la enzima eNOS y el contenido de  $GMP_c$  en el músculo, y que en animales diabéticos tipo I existe una regulación a la alta de la actividad RhoK que disminuiría la formación de NO derivado del endotelio en el pene (Bivalacqua et al., 2004a). Una serie de estudios recientes, revelaron que el complejo RhoA/RhoK inhibe la vía de

señalización del NO/GMP<sub>o</sub>/PKG a nivel vascular. Sauzeau y col. (2003) demostraron que la vasodilatación producida por el NO se produce en parte por la fosforilación de la proteína RhoA mediada por la PKG, y que de esta manera dicha fosforilación impediría la interacción entre la proteína RhoA y la membrana plasmática, y por tanto toda la ruta de señalización asociada a ella. En otros experimentos *in vivo* se observó el efecto de la inhibición de la ruta de señalización de RhoK tras la inyección intracavernosa de un donante de NO y se midió la respuesta eréctil antes y después de la administración de una dosis submaximal del inhibidor Y-27632. A bajas dosis de Y-27632 se incrementa significativamente la respuesta del donante de NO, y la combinación de ambos provocó un gran incremento de la respuesta en relación a la administración de aislada de NO (Mills et al., 2002b). Estos resultados sugieren que la vasodilatación mediada por NO/GMP<sub>o</sub>/PKG provoca erección al inhibir la vasoconstricción regulada por RhoA/RhoK en el tejido eréctil peneano.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La disfunción eréctil orgánica o periférica, que en un porcentaje muy alto de los casos es *vasculogénica* se produce normalmente por una alteración del balance metabólico entre factores relajantes y contráctiles que operan a nivel del tejido eréctil del pene, de forma que los factores contráctiles predominan, y los relajantes se encuentran disminuidos. La disfunción eréctil es considerada en la actualidad como un marcador potencial de enfermedad cardiovascular, ya que comparte con ésta muchos factores de riesgo, como la edad, el tabaquismo, el consumo de bebidas alcohólicas o el uso de algunos fármacos, y coexiste con enfermedades como la diabetes y la hipertensión (Laumann et al., 1999; Johannes et al., 2000; Araujo et al., 2009). La disfunción eréctil es un problema común en los varones diabéticos y está asociada con la neuropatía diabética y la enfermedad vascular periférica. Se ha descrito que puede aparecer en más del 50 % de los diabéticos en los 10 años siguientes al diagnóstico de la diabetes, e incluso puede estar presente en el momento de su aparición clínica (Khan et al., 2001). Su prevalencia es de entre 50% y 70% en los pacientes diabéticos y aumenta hasta el 90% cuando se alcanza los 70 años (Khan et al., 2001).

Desde un punto de vista fisiológico, la erección y detumescencia peneanas son procesos hemodinámicos regulados por la relajación y contracción, respectivamente, del tejido eréctil. Durante la detumescencia predomina la influencia nerviosa simpática, y el músculo liso arterial y trabecular se encuentran tónicamente contraídos. En el proceso de erección, la activación parasimpática y la liberación de óxido nítrico (NO) de las terminaciones nerviosas y del endotelio origina una vasodilatación que permite el incremento del flujo de sangre a través de las arterias helicinas y el llenado de los sinusoides cavernosos (Andersson y Wagner, 1995). Debido a que la relajación del músculo liso arterial y trabecular del pene es necesaria para desencadenar y mantener la erección, los tratamientos farmacológicos que se utilizan con mayor frecuencia y éxito en el tratamiento de la disfunción eréctil orgánica están basados en conseguir una relajación efectiva del tejido arterial y trabecular mediante el uso de agentes vasoactivos, como es el caso de la prostaglandina (PG) E<sub>1</sub> mediante administración intracavernosa. En los últimos

años se han desarrollado diversos fármacos de administración oral utilizados con éxito en el tratamiento oral de la disfunción eréctil que pertenecen al grupo de inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5), como el Sildenafil (Viagra®). Estos fármacos actúan a nivel periférico y tienen un mecanismo de acción basado en la potenciación de las respuestas relajantes del tejido eréctil mediadas por el NO y en el incremento de los niveles intracelulares de GMP<sub>c</sub> (Moreland et al., 2001; Prieto et al., 2006). Sin embargo, este tipo de tratamientos presenta una eficacia mucho menor en algunos pacientes diabéticos con disfunción eréctil que en la población general de pacientes impotentes (Carson et al., 2002; Goldstein et al., 2003; Fonseca y Jawa, 2005; Vardi, 2009) y durante el desarrollo de otras enfermedades que cursan con disfunción endotelial severa.

Por otro lado, la regulación nerviosa contráctil del lecho vascular peneano está mediada casi exclusivamente por nervios adrenérgicos que actúan principalmente sobre receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos localizados en el músculo liso. También a nivel local, diversos metabolitos del ácido araquidónico como el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y la prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) actúan como vasoconstrictores en la circulación peneana a través de receptores en el músculo liso. Los niveles de estos autacoides están anormalmente elevados en condiciones fisiopatológicas de inflamación y estrés oxidativo y así como en el curso de enfermedades como la hipertensión y la diabetes que por afectar a los vasos peneanos son también causa de disfunción eréctil. Es posible, por tanto, que el antagonismo farmacológico de la acción de estos agentes contráctiles facilite la relajación del músculo liso peneano y por tanto conlleve a la erección.

El Ca<sup>2+</sup> es un segundo mensajero que participa de forma importante en el proceso de contracción de la célula muscular lisa y la elevación de los niveles citosólicos de este ión mediante su entrada a través de la membrana plasmática o su liberación de los depósitos intracelulares es un paso esencial en el desarrollo de la vasoconstricción arterial. Si bien las características fisiológicas de los nervios, receptores y factores locales incluyendo los endoteliales responsables de la erección peneana han sido ampliamente

estudiados, es escasa la información referente a los mecanismos de señalización en los que interviene el  $\text{Ca}^{2+}$  en los procesos contráctiles del tejido eréctil. En este sentido, el sistema RhoA/RhoK, que juega un papel clave en los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  y al que también se ha atribuido un papel en el control de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso vascular (Ghisda et al., 2003), está implicado en la regulación de la función eréctil y en el mantenimiento de la flacidez, y los inhibidores de la RhoK inducen erección en modelos animales *in vivo* (Chitaley et al., 2001).

Por todo lo expuesto, un conocimiento profundo de los mecanismos de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  implicados en la vasoconstricción del tejido eréctil peneano se hace necesario con el fin de explorar nuevas diana terapéuticas para el tratamiento de la disfunción eréctil, especialmente teniendo en cuenta el caso de los pacientes diabéticos y con enfermedades vasculares en los que la función endotelial y la disponibilidad de NO están comprometidas, y que presentan una mayor resistencia al tratamiento con inhibidores orales de PDE-5. Por tanto, los objetivos del presente trabajo han sido los siguientes:

1. Determinar la contribución de los mecanismos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  a la vasoconstricción arterial peneana.
2. Determinar el papel de RhoK en los mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en el tejido eréctil, así como su posible implicación en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular.
3. Establecer un modelo experimental para el estudio del metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  en la vasculopatía diabética peneana, determinando la estructura y la reactividad vascular de las arterias peneanas de forma comparativa con las arterias coronarias en la rata Zucker obesa.
4. Determinar si variaciones en los mecanismos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o en los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  contribuyen a la disfunción vascular de las arterias peneanas de animales diabéticos.





### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. MATERIAL

### 1.1. Material biológico

#### 1.1.1. Animales

Todos los animales del presente estudio fueron utilizados de acuerdo con la legislación vigente sobre protección de animales de experimentación y otros fines científicos (R.D. 1201/2005). Los protocolos experimentales correspondientes fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

##### *1.1.1. a. Ratas Wistar Kioto*

Se emplearon arterias peneanas obtenidas de ratas de la raza Wistar Kioto, criadas y mantenidas en el animalario del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Los ejemplares utilizados fueron machos de 3 meses de edad.

##### *1.1.1. b. Ratas Zucker*

Como modelo animal mejor conocido de Síndrome Metabólico se utilizaron ratas macho Zucker obesas (OZR) de 17-18 semanas de edad y sus controles ratas Zucker delgadas (LZR) de la misma edad, proporcionadas por *Charles River* (Barcelona, España) y mantenidas hasta su utilización en el animalario de la S.D. de Fisiología (F. Animal) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. El mismo día del experimento y previo a la decapitación, los animales fueron pesados y se recogieron muestras de sangre para la posterior determinación en el plasma de los niveles de glucosa, colesterol total y triglicéridos mediante *kits* comerciales. Los niveles de insulina plasmática fueron valorados por ELISA. La presión arterial sistólica y el latido cardíaco fueron determinados diariamente durante una semana mediante pletismografía en la cola de los animales.

## 1.2. Instrumentación general

Los aparatos utilizados para la realización de soluciones y medios fisiológicos se enumeran a continuación: balanza de precisión Sartorius, agitadores magnéticos, pHmetro Crison 2001 y sistema de filtración Milli-Q (Millipore<sup>TM</sup>). Se han utilizado también, baños termostatzados modelo Thermomix 1420, un espectrofotómetro (modelo VR2000), agitadores de balanceo y un calentador-agitador para tubos modelo Thermomixer Comfort (Eppendorf).

Para la disección de las preparaciones arteriales, se emplearon un microscopio estereoscópico y una fuente de luz fría (Leica).

## 1.3. Reactivos y soluciones

Todos los medios y soluciones se prepararon con sales inorgánicas Merck de grado analítico disueltas en agua desionizada de alta pureza (MilliQ). Los compuestos y reactivos utilizados en cada uno de los ensayos realizados fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (España), Merck (Alemania), Tocris (Gran Bretaña), Molecular Probes (Estados Unidos).

A continuación se detalla la composición de las soluciones empleadas:

### Solución salina fisiológica (PSS):

La composición de la solución salina fisiológica (PSS) utilizada fue la siguiente (en mM):

- Cloruro sódico (NaCl) ..... 119.0
- Bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) ..... 25.0
- Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) ..... 11.0
- Cloruro potásico (KCl) ..... 4.6
- Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ..... 1.4
- Cloruro magnésico (MgCl<sub>2</sub>) ..... 1.2
- Cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>) ..... 1.5
- Ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA) ..... 0.027

La solución se preparaba a diario y los reactivos necesarios se diluían conjuntamente en agua destilada. La mezcla se dejaba oxigenar durante 20 minutos con carbógeno (95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub>) y finalmente se añadía el CaCl<sub>2</sub>. El EDTA se añadía con el fin de retrasar la oxidación e impedir el crecimiento bacteriano.

#### Solución salina fisiológica rica en potasio (KPSS):

La solución salina fisiológica rica en potasio se preparaba diariamente igual que la anterior. Su composición es (en mM):

- Cloruro potásico (KCl)..... 119.0
- Bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) .....25.0
- Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) ..... 11.0
- Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) .....1.4
- Cloruro magnésico (MgCl<sub>2</sub>) ..... 1.2
- Cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>) ..... 1.5
- Ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA) ..... 0.027

Para la preparación de PSS rica en K<sup>+</sup> (KPSS) se reemplazó en concentraciones equimoleculares el NaCl por KCl. De igual forma la solución se preparaba a diario y los reactivos necesarios se diluían conjuntamente en agua destilada, la mezcla se dejaba oxigenar con carbógeno durante 20 minutos y finalmente se añadía el CaCl<sub>2</sub>.

#### Soluciones salinas fisiológicas libres de Ca<sup>2+</sup>:

La composición de las soluciones fisiológicas libres de Ca<sup>2+</sup> (PSS<sup>0</sup>) fue similar a la del PSS. Se prepararon sustituyendo el CaCl<sub>2</sub> por 0.1 mM de EGTA (PSS<sup>0</sup><sub>0.1</sub>) y omitiendo el CaCl<sub>2</sub> y el EGTA (PSS<sup>0</sup><sub>0</sub>) para la elaboración del “PSS nominalmente libre de Ca<sup>2+</sup>”.

Solución para preparaciones permeabilizadas “Relaxing solution”:

A) Solución base (en mM):

- Metano sulfonato potásico..... 130
- Tris maleato.....20
- EGTA..... 2
- Cloruro magnésico (MgCl<sub>2</sub>) .....4

Se ajusta el pH a 6.5 con KOH suprapuro y se conserva en la nevera

B) Diariamente se añade (en mM):

- Creatina fosfato ..... 10.0
- Na<sub>2</sub>ATP•3H<sub>2</sub>O ..... 4.0
- Creatinina fosfoquinasa (mg/mL).....0.1

pH = 7.1

Soluciones de calibración para los experimentos de FURA-2:

*K<sup>+</sup>-Hepes<sup>0</sup>*

- |   | Concentración (mM) |
|---|--------------------|
| • Cloruro potásico (KCl).....                                   | 144.6              |
| • Cloruro magnésico (MgCl <sub>2</sub> ) .....                  | 1.2                |
| • HEPES .....   | 5.0                |
| • Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )..... | 6.1                |
| • EGTA.....   | 2.0                |

pH = 7.45

*K<sup>+</sup>-Hepes<sup>5</sup>*

- |   | Concentración (mM) |
|---|--------------------|
| • Cloruro potásico (KCl).....                                   | 144.6              |
| • Cloruro magnésico (MgCl <sub>2</sub> ) .....                  | 1.2                |
| • Cloruro cálcico (CaCl <sub>2</sub> ) .....                    | 5.0                |
| • HEPES .....   | 5.0                |
| • Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )..... | 6.1                |

pH = 7.45

Tampón de lisis para la extracción de proteínas:

	Concentración
• Tris-HCl (mM) .....	10
• Metavanadato sódico (mM).....	1
• SDS (%).....	1

Tampón Laemmli:

	Concentración
• Tris-HCl (mM) .....	125
• EDTA (mM).....	15
• Glicerol (%).....	20
• β-mercaptoetanol (%) .....	10
• SDS (%).....	4
• Azul de bromofenol (%) .....	4

Tampón de electroforesis:

	Concentración
• Glicina (mM).....	960.0
• Tris-HCl (mM) .....	125.0
• SDS (%).....	10.0

Tampón de transferencia:

	Concentración
• Glicina (mM) .....	190.0
• Tris-HCl (mM) .....	25.0
• Metanol puro (%) .....	20.0
• SDS (%).....	0.05

pH = 8.3

Tampón de lavado:

	Concentración
• NaCl 5M (mM) .....	100.0
• Tris-HCl 2M (mM) .....	10.0



- Tween-20 (%) .....0.1

Tampón fosfato salino (PBS):

	Concentración (mM)
• NaCl .....	137.0
• KCl .....	2.6
• KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1.5
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	8.1

pH = 7.4

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Estudios funcionales

#### 2.1.1. Preparación y microdisección de las preparaciones arteriales

En el presente estudio se utilizaron arterias peneanas procedentes de ratas Wistar Kioto y arterias coronarias y peneanas de ratas Zucker las cuales se sacrificaron por traumatismo cervical y exanguinación. Rápidamente se extrajo el corazón y el pene con la ayuda de unas pinzas de disección romas y un bisturí y se introdujeron en solución salina fisiológica (PSS) mantenida a 4-8 °C (ver Apartado 1.3).

Las ramas de segundo orden tanto de la arteria peneana dorsal como de la arteria coronaria descendente izquierda fueron disecadas cuidadosamente retirando el tejido graso y el conectivo, y el miocardio adherido, respectivamente, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y una fuente de luz fría, con material empleado habitualmente en cirugía oftálmica.

Se obtuvieron segmentos arteriales de 2 mm de longitud que se situaron en la cámara del miógrafo y se montaron sobre alambres de 40 µm de diámetro. Las preparaciones se estabilizaron en PSS a 37°C aireado con 95% O<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> durante 30 minutos.

### 2.1.2. Montaje de las arterias

Las arterias fueron montadas en miógrafos microvasculares para la determinación de la tensión isométrica (Danish MyoTechnology, Aarhus, Dinamarca). El miógrafo dispone de una parte fija conectada a un transductor de fuerza isométrico y una parte móvil unida a un tornillo micrométrico. A través de la luz vascular se introdujeron dos alambres de acero de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro fijando cada uno de los alambres a las dos partes del miógrafo mediante dos tornillos presentes tanto en la parte móvil como en la fija.

### 2.1.3. Normalización de las arterias

Una vez montadas en el miógrafo las preparaciones arteriales, el protocolo de normalización permitió establecer el diámetro idóneo de trabajo para cada preparación. Los vasos se mantuvieron en PSS, a 37°C y aireados con 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4) durante 30 minutos y tras este tiempo se procedió a la determinación mediante un programa informático de la relación entre la tensión de reposo de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso, y a partir de aquí se calculó la circunferencia interna ( $L_{100}$ ) correspondiente a una presión transmural de 100 mm de Hg para un vaso relajado *in situ*. A continuación, las arterias fueron colocadas a una circunferencia interna  $L_1$ , siendo  $L_1 = 0.9 \times L_{100}$ , circunferencia a la cual el desarrollo de fuerza es máximo en estas arterias. El diámetro luminal interno efectivo de cada arteria fue determinado como  $l_1 = L_1 / \pi$  (Mulvany y Halpern, 1977).

## **2.2. Determinación del calcio intracelular por ratio-fluorometría**

### 2.2.1. Introducción a la fluorescencia

La medida de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) mediante el empleo de sondas fluorescentes ha sido el método más extendido para el estudio de la sensibilización al Ca<sup>2+</sup> y la entrada dinámica de Ca<sup>2+</sup> a través de la membrana en el músculo liso vascular (Himpens y Casteels, 1987). La sonda fluorescente fura-2 fue introducida como indicador de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  con numerosos

aspectos mejorados comparado con otros indicadores que ya habían sido usados previamente tales como quin2 (Grynkiewicz et al., 1985). En la molécula fura-2, cuatro grupos carboxilo proporcionan el sitio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y un grupo derivado del estilbeno le confiere sus propiedades fluorescentes. Así, el fura-2 es una molécula hidrofílica que se une al  $\text{Ca}^{2+}$  de forma específica pero que en su forma acetoximetil ester (fura-2-AM) se convierte en una molécula hidrofóbica capaz de atravesar sin dificultad las membranas biológicas. Una vez ésta se localiza en el citosol, las esterasas romperán los enlaces éster liberando su forma ácido, la cual debido a su carácter hidrofílico queda atrapada en el interior celular pudiendo unirse al  $\text{Ca}^{2+}$  libre para formar el complejo fura- $\text{Ca}^{2+}$ . En cualquier caso, la molécula de fura-2 muestra propiedades fluorescentes tanto en su forma libre como su forma unida al  $\text{Ca}^{2+}$ , pero es en esta forma cuando su fluorescencia se incrementa hasta dos veces y su espectro excitación se desplaza a longitudes de onda menores (alrededor del rango de 362 a 335 nm). La excitación fluorescente de este complejo da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se sitúa a 510 nm.

Este desplazamiento en la longitud de onda se mide como ratio entre la emisión a una longitud de onda de excitación a 340 nm ( $F_{340}$ ) y a 380 nm ( $F_{380}$ ). El ratio ( $R = F_{340}/F_{380}$ ) se relaciona con la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por la siguiente ecuación (Grynkiewicz et al., 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot ((R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)) \cdot (F_{380, \max} / F_{380, \min})$$

Donde,  $K_d$  es la constante de disociación del complejo fura-2/ $\text{Ca}^{2+}$ .  $R_{\min}$  y  $R_{\max}$  son el ratio mínimo (ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y ratio máximo (saturación de  $\text{Ca}^{2+}$ ), respectivamente.  $F_{380, \max}$  y  $F_{380, \min}$  son la emisión máxima (ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y emisión mínima (saturación de  $\text{Ca}^{2+}$ ) con excitación a 380 nm.

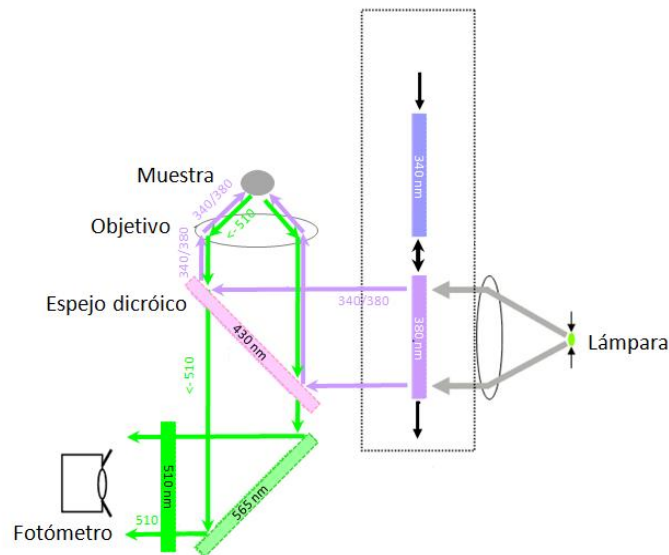
### 2.2.2. Medidas simultáneas de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular y tensión isométrica

Las medidas simultáneas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y tensión llevadas a cabo en este estudio fueron realizadas en arterias peneanas montadas en un miógrafo simple como se describe en el apartado 2.1.2, y de acuerdo con la técnica inicialmente descrita para arterias de resistencia mesentéricas (Jensen et al., 1992). El protocolo de “cargado” con fura-2 se puso a punto de forma

específica para las arterias peneanas, y se realizó incubando las preparaciones arteriales con fura-2-AM (8  $\mu$ M) durante 3 horas a 37 °C en la oscuridad, lavando 3 veces en PSS después de una hora y media (Villalba et al., 2007).

El miógrafo se colocó sobre la pletina de un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100, donde la preparación fue iluminada de forma alterna con dos longitudes de onda diferentes, 340 y 380 nm a una frecuencia de 10 Hz. La selección de estas longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de soluciones de fura-2 saturadas de  $\text{Ca}^{2+}$  (340 nm) y de fura-2 libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (380 nm). El haz de luz monocromada se conduce desde una rueda de filtros hasta el microscopio con una guía líquida. La luz es reflejada hacia el objetivo mediante un espejo dicróico que transmite las longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las longitudes de onda inferiores. De este modo, sólo alcanzan la muestra la luz de 340 y 380 nm, mientras que la luz fluorescente emitida por el fura-2 en el rango de 500 a 530 nm atraviesa el espejo dicróico y es conducida al fotomultiplicador pasando a través de un filtro interferencial de paso de banda centrado en 510 nm. La fluorescencia de emisión a las dos longitudes de onda ( $F_{340}$  y  $F_{380}$ ) y la fuerza (mN) son registradas simultáneamente mediante el software Felix (Photon Technology International, USA). Los valores indicados anteriormente ( $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$ ,  $F_{380,\max}$  y  $F_{380,\min}$ ) se determinaron mediante un método que compromete la viabilidad de la preparación y que por lo tanto se realiza al final de cada protocolo experimental. Las condiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mínimas y de saturación se realizaron mediante la incubación de la preparación con el ionóforo ionomicina en una solución con EGTA ( $\text{K}^+$ -Hepes<sup>0</sup>) y con una solución rica en  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}^+$ -Hepes<sup>5</sup>), respectivamente (ver Apartado 1.4). Finalmente, la contribución de la autofluorescencia de la preparación se determinó mediante “*quenching*” del fura-2 con  $\text{Mn}^{2+}$  cuyos valores obtenidos fueron sustraídos de todas las medidas obtenidas durante el experimento.

Los registros que se muestran en este trabajo corresponden a la relación o ratio entre la fluorescencia a 340 y 380 nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) en función del tiempo expresados bien como valores absolutos o como porcentaje de las señales máximas de calcio en cada arteria inducidas por una solución rica en  $K^+$  (KPSS).



**Figura 8. Esquema representativo del sistema de microfluorimetría.** La luz de excitación proviene de una rueda de filtros (340 y 380 nm) que llega al microscopio a través de una guía líquida, se refleja en un espejo dicróico centrado en 430 nm y alcanza la preparación a través del objetivo del microscopio. La luz fluorescente emitida por el fura-2 intracelular es capturada por el objetivo, atraviesa el espejo dicróico (>430 nm) y se dirige hasta el filtro de emisión centrado en 510 nm hasta el fotómetro.

### 2.3. Experimentos de permeabilización de las arterias con $\alpha$ -toxina

Las arterias peneanas de ratas Wistar Kioto se permeabilizaron in vitro usando la  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus* mediante un método desarrollado por Jensen y col. (Jensen et al., 1996) para arterias de resistencia con modificaciones específicas para adecuarlo a nuestra preparación. Las arterias se disecaron y a continuación permeabilizaron mediante la incubación con  $\alpha$ -toxina (5000 U/mL) en “relaxing solution” (ver composición en el Apartado 1.4) con 4 mM EGTA, durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez permeabilizadas, las arterias se montaron en el miógrafo en “relaxing solution”

(cuya concentración de EGTA fue cambiada a 2 mM en lugar de 4 mM) y sometidas a la tensión de trabajo ( $I_1$ ) como se detalla en el apartado 2.1.3. Los experimentos realizados con las preparaciones permeabilizadas fueron realizados siempre a temperatura ambiente y en presencia de 100 %  $O_2$ . Con objeto de determinar la eficiencia del proceso de permeabilización, las arterias se estimularon con una dosis maximal de  $Ca^{2+}$  (pCa libre 4.9) el cuál debía proporcionar un desarrollo gradual de tensión. El cálculo de la concentración de  $Ca^{2+}$  libre presente en el baño del miógrafo durante el experimento fue obtenido mediante un programa informático basado en los estudios de Tsien y Pozzan (Tsien y Pozzan, 1989).

## **2.4. Protocolos experimentales para los estudios funcionales**

### 2.4.1. Protocolos experimentales realizados en ratas Wistar Kioto

#### *2.4.1.1. Estudio de los mecanismos de calcio acoplados al receptor $\alpha_1$ -adrenérgico*

Antes de la realización del protocolo experimental correspondiente, la viabilidad de las preparaciones arteriales se determinó mediante la estimulación con una solución fisiológica rica en potasio (KPSS) (ver composición en el Apartado 1.4). En el caso de los experimentos donde se utilizaron arterias con el endotelio intacto, su integridad fue comprobada mediante la capacidad de la acetilcolina de inducir relajación en arterias precontraídas con fenilefrina (1  $\mu$ M). En aquellas arterias que mostraron valores de relajación a la acetilcolina como mínimo del 50 % se tomaron como arterias con endotelio intacto. En los experimentos donde se retiró mecánicamente el endotelio vascular mediante la inserción en el lumen vascular de un cabello humano (Prieto et al., 1998) la ausencia del endotelio se comprobó mediante la ausencia de relajación a la acetilcolina de las preparaciones arteriales.

#### *2.4.1.1.a. Estudio de la entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular*

El estudio del papel de la entrada de  $Ca^{2+}$  en la respuesta contráctil inducida por el agonista adrenérgico fenilefrina, se llevó a cabo mediante la

realización de curvas dependientes de la concentración para este agonista ( $10^{-8}$  M- $10^{-5}$  M) en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Una vez realizada la curva control, las arterias fueron mantenidas en PSS durante 45 minutos y entonces la solución del baño fue cambiada por PSS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0.1 mM EGTA) donde se mantuvieron las arterias por 5 minutos. El baño del miógrafo se llenó de *PSS nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$*  (0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0 mM EGTA) y bajo estas condiciones se realizó una segunda curva concentración respuesta (CCR) para fenilefrina.

Con objeto de investigar la participación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L en la vasoconstricción inducida por fenilefrina, las arterias se incubaron durante 30 minutos con una dosis submaximal de nifedipina (0.3  $\mu\text{M}$ ). Los efectos del bloqueante no selectivo de canales de cationes SKF96365 y del 2-aminoetoxidifenilborato (2-APB) fueron evaluadas inicialmente sobre arterias precontraídas con una dosis submaximal de fenilefrina o con KPSS (en este caso, las arterias se incubaron con fentolamina para evitar la liberación neural de noradrenalina).

El estudio del papel de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en la contracción de las arterias peneanas se llevó a cabo mediante el uso del inhibidor selectivo de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) con ácido ciclopiazónico. Los efectos contráctiles del ácido ciclopiazónico se evaluaron inicialmente en arterias con y sin endotelio en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y bajo condiciones de bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L con nifedipina.

Para investigar si el vaciamiento de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico induce una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (entrada capacitativa) en las arterias peneanas, las arterias se mantuvieron en *PSS nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$*  y nifedipina (0.3  $\mu\text{M}$ ) durante 10 minutos. El ácido ciclopiazónico (30  $\mu\text{M}$ ) fue entonces añadido al baño y después de 10 minutos se readicionó  $\text{Ca}^{2+}$  (1.5 mM). También se estudiaron los efectos del 2-APB (50 M) sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales diferentes de los de tipo L inducida tanto por fenilefrina como por ácido ciclopiazónico.

#### *2.4.1.1.b. Estudio de la inhibición de la quinasa Rho sobre la activación del receptor $\alpha_1$ -adrenérgico*

En arterias peneanas de la rata, se evaluaron los efectos del inhibidor selectivo de la quinasa Rho (RhoK), Y-27632 sobre la estimulación eléctrica transmural (EET) y sobre la vasoconstricción adrenérgica. La EET se llevó a cabo mediante pequeños electrodos de platino colocados en el miógrafo y a su vez conectados a un estimulador eléctrico (Caberte, CS20, Barcelona, Spin) (Simonsen et al., 1997). Los experimentos de EET se realizaron a un amperaje de 35 Ma, pulsos de 0.3 ms de duración durante 20 segundos a frecuencias comprendidas entre 1 – 32 Hz (Simonsen et al., 1997). Estos parámetros de EET producen respuestas contráctiles neurogénicas que son abolidas por tetrodo toxina en arterias peneanas (Simonsen et al., 1997). Con objeto de determinar la influencia de la inhibición de la quinasa Rho sobre las contracciones inducidas por la EET de los nervios perivasculares presentes en la pared arterial, se realizaron curvas frecuencia-respuesta en presencia y ausencia de una dosis submaximal del inhibidor Y-27632 (10  $\mu$ M). Este grupo de experimentos se realizó en presencia de  $N^G$ -nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu$ M) (Prieto et al., 1998) con objeto de evitar la liberación de NO de las terminaciones nerviosas. Con objeto de confirmar que las respuestas contráctiles obtenidas con la EET eran de origen adrenérgico, las arterias se incubaron durante 1 hora con guanetidina (10  $\mu$ M) (Prieto et al., 2000). Así, se realizaron curvas frecuencia-respuesta antes y después de la denervación adrenérgica con guanetidina. También se estudiaron los efectos del Y-27632 sobre las contracciones inducidas por la estimulación del receptor adrenérgico  $\alpha_1$  mediante la adición de fenilefrina. Así, se realizaron CCR para fenilefrina en presencia y ausencia de Y-27632 (10  $\mu$ M).

#### *2.4.1.1.c. Estudio de la inhibición de la quinasa Rho sobre los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y tensión isométrica*

Se estudiaron los efectos de la inhibición de la quinasa Rho realizando curvas dependientes de la concentración del inhibidor Y-27632 (0.1 – 100  $\mu$ M)



añadiendo dosis crecientes del mismo sobre arterias peneanas precontraídas con una dosis submaximal de fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ ) y por otro lado sobre arterias sometidas a despolarización con KPSS. En este último caso, las arterias se incubaron con fentolamina (0.3  $\mu\text{M}$ ) con objeto de evitar los efectos de la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas.

Con objeto de descartar una posible acción inespecífica del Y-27632 sobre la PKC, se realizaron curvas concentración respuesta para el inhibidor de la PKC, Ro31-8220 sobre los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y tensión isométrica en arterias precontraídas con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ).

Además, determinamos los efectos de Y-27632 sobre los cambios inducidos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y tensión isométrica inducidas por la fenilefrina bajo condiciones de bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L con nifedipina (1  $\mu\text{M}$ ) y sobre la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  con ácido ciclopiazónico (30  $\mu\text{M}$ ).

En otro grupo de experimentos, utilizamos  $\text{Ba}^{2+}$  ( $\text{BaCl}_2$ , 1 mM) en lugar de  $\text{Ca}^{2+}$  con el fin de evaluar la entrada de cationes divalentes a través de la membrana durante la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico (Inoue et al., 2001; Ghisdal et al., 2003). Se utilizó el bloqueante no selectivo de canales de cationes SKF96365 (100  $\mu\text{M}$ ) al final de cada uno de los experimentos sobre las arterias estimuladas con fenilefrina, para así confirmar que la entrada de  $\text{Ba}^{2+}$  se realiza a través de canales no-selectivos de cationes.

#### *2.4.1.1.d. Estudio de la sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ en arterias peneanas*

En arterias permeabilizadas, se realizaron curvas concentración respuesta mediante la adición de dosis crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$  libre de 10 nM a 10 M. En arterias precontraídas con concentraciones umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  (pCa 7) y en presencia de fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ) se realizaron curvas dependientes de la concentración de guanosina-5 $\gamma$ -O-(3-tiotrifosfato) (GTP- $\gamma$ -S,  $10^{-7}$  M –  $10^{-5}$  M) para evaluar los efectos de la activación no selectiva de receptores acoplados a proteínas G y selectiva del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico.

El papel de diferentes quinasas en los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por GTP y fenilefrina en las arterias peneanas de la rata fue

determinado mediante el empleo de inhibidores selectivos de PKC, Gö6983 (3  $\mu\text{M}$ ), tirosina quinasa, tyrphostin A23 (AG-18) (100  $\mu\text{M}$ ) y RhoK, fasudil (10  $\mu\text{M}$ ). Además, se evaluaron los efectos del inhibidor de la RhoK, Y-27632 tanto sobre la activación no selectiva de receptores acoplados a proteínas G (GTP- $\gamma$ -S, 3  $\mu\text{M}$ ) como la selectiva del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico con fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ) y GTP- $\gamma$ -S (1  $\mu\text{M}$ ), en arterias precontraídas con  $\text{Ca}^{2+}$  (pCa 6.71).

#### 2.4.1.2. Estudio de los mecanismos de $\text{Ca}^{2+}$ acoplados al receptor de $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ (TP)

La viabilidad de las preparaciones arteriales se comprobó, como se ha descrito en el apartado anterior, mediante la estimulación con KPSS. Se realizaron medidas simultáneas de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y tensión isométrica en presencia y en ausencia del antagonista selectivo de los receptores del tromboxano  $\text{A}_2$  SQ29548 (1  $\mu\text{M}$ ) estimuladas con una dosis única del análogo sintético del tromboxano  $\text{A}_2$  U46619 (0.1  $\mu\text{M}$ ).

La contribución relativa del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en la vasoconstricción inducida por U46619 en el tejido arterial peneano se evaluó mediante el protocolo descrito en el apartado 2.2.1.1.a para el receptor  $\alpha_1$ -adenérgico, pero estimulando las arterias con una dosis única de U46619 (0.1  $\mu\text{M}$ ) durante 10 minutos, en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para investigar el papel de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta inducida por el U46619, se realizaron medidas simultáneas de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y tensión para el U46619 en presencia y ausencia de nifedipina (1  $\mu\text{M}$ ), nifedipina y 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ) o nifedipina y SKF96365 (100  $\mu\text{M}$ ). Las arterias fueron incubadas durante 15 minutos con cada uno de los tratamientos y a continuación fueron estimuladas con U46619.

El estudio de la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado de los depósitos intracelulares sobre la respuesta contráctil del U46619 se evaluaron con el bloqueante de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico, ácido ciclopiazónico. Se añadió una dosis submaximal de U46619 (0.1  $\mu\text{M}$ ) durante 10 minutos. A continuación, se realizaron lavados durante 20 minutos y posteriormente se añadió el ácido ciclopiazónico (30  $\mu\text{M}$ ) que se mantuvo durante 20 minutos. Finalmente se añadió una segunda dosis de agonista,

permaneciendo en el baño durante 10 minutos. Los efectos del ácido ciclopiazónico se estudiaron sobre la respuesta contráctil del U46619 (0.1  $\mu$ M) a dos tiempos diferentes, 5 y 10 minutos después de la adición del U46619 al baño.

El efecto de la quinasa Rho sobre la vasoconstricción peneana se evaluó utilizando el bloqueante selectivo Y-27632 ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) sobre las contracciones inducidas por el U46619 (0.1  $\mu$ M). También se estudiaron los efectos de la inhibición de otras quinasas, como la PKC y así como su inhibición combinada sobre la respuesta contráctil inducida por el U46619.

#### 2.4.2. Protocolos Experimentales para los estudios funcionales realizados en ratas Zucker

Se montaron en paralelo en un mismo miógrafo microvascular doble y se evaluó conjuntamente la funcionalidad de una arteria procedente de un animal control, LZR, y de una arteria de un animal OZR. Al principio de cada experimento se procedió a la comprobación de la viabilidad arterial mediante la estimulación de las arterias con KPSS. Tanto la función endotelial como las respuestas vasoconstrictoras fueron evaluadas en arterias coronarias y peneanas de ratas Zucker obesas y control. Se usaron diferentes agonistas vasoconstrictores para cada uno de los diferentes lechos vasculares estudiados. En el caso de las arterias peneanas, se utilizó noradrenalina mientras en las arterias coronarias, serotonina. Así, mientras el tejido eréctil posee una rica innervación simpática la cual es responsable del estado de erección por un lado y por otro del mantenimiento del estado de detumescencia mediante la liberación tónica de noradrenalina (Giuliano et al., 1993), el lecho coronario recibe también innervación adrenérgica, pero siendo predominante el subtipo de receptores  $\beta$  (efecto relajante) y solamente las contracciones a la noradrenalina son desenmascaradas bajo el bloqueo de la población de dichos receptores (Nyborg, 1990). Debido a que la serotonina proporciona contracciones estables y reproducibles en las arterias coronarias, le hacen el vasoconstrictor de elección para el estudio de las respuestas vasoconstrictoras.

Las respuestas contráctiles a agonistas exógenos se evaluaron tanto en arterias peneanas, donde se utilizó noradrenalina como en las coronarias, donde se empleó serotonina. Por otro lado, las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio vascular se estudiaron mediante la realización de CCR para la acetilcolina en arterias precontraídas con 1  $\mu$ M fenilefrina (arterias peneanas) o 20  $\mu$ M serotonina (5-HT) (arterias coronarias). Además, también se estudiaron de manera comparativa en ambos lechos vasculares, la relajación inducida por el donante de NO, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP).

Con objeto de estudiar si las alteraciones en la producción endógena de NO son las responsables de la alteración tanto en las respuestas dependientes del endotelio como en las respuestas vasoconstrictoras tanto de las arterias peneanas como de las arterias coronarias de animales obesos y sus controles, las respuestas a la acetilcolina, noradrenalina, serotonina y al inhibidor de PDE-5 sildenafil, fueron evaluadas después del bloqueo de la sintasa del NO con N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu$ M), el cual fue añadido al baño del miógrafo 30 minutos antes de la realización de la segunda curva dependiente de la concentración para cada uno de los agonistas.

La producción de aniones superóxido en la pared arterial se estudió mediante el empleo de superóxido dismutasa (SOD, 150 U/mL), añadido antes de la construcción de la CCR de noradrenalina, serotonina o acetilcolina.

## **2.5. Determinación por Western Blotting de proteínas de la pared arterial**

### **2.5.1. Determinación de la expresión de la proteína TRP6 y de la enzima eNOS**

Los ensayos de Western blotting se han realizado en homogenados obtenidos a partir de arterias aisladas de ratas Wistar Kioto (arteria peneana dorsal) o ratas Zucker (arteria peneana dorsal y arteria coronaria descendente izquierda) como se detalla a continuación.

Una vez disecadas las arterias, éstas se homogenizaron manualmente mediante un microhomogenizador de vidrio en 70-100  $\mu$ L de tampón de lisis. A

continuación, se centrifugaron las muestras a 13000 rpm a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante de esta centrifugación que contiene las proteínas solubilizadas se alicuotó en un tubo eppendorf y parte de él se reservó para la medida de proteínas totales mediante el método de Lowry (BioRad DC Protein Assay). Las mismas cantidades de proteínas fueron cargadas en los geles de poliacrilamida al 10 % (p/v) en presencia de dodecilsulfato sódico al 5 % (SDS). La separación de las mismas se realizó mediante electroforesis durante aproximadamente durante 2 horas a un voltaje constante de 80 V. La electroforesis se desarrolló en un tampón de electroforesis cuya composición se indica en el Apartado 1.4.

A continuación, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas a la membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) a una intensidad de 230 mA durante 28 horas a 4 °C en un tampón de transferencia (ver composición en el Apartado 1.4). Una vez finalizada, la membrana se bloqueó en tampón PBS (ver composición en el Apartado 1.4) conteniendo 5 % de leche desnatada en polvo durante al menos 1 hora con agitación. A continuación, las membranas fueron expuestas a los diferentes anticuerpos primarios (Tabla 2) en tampón PBS-Tween 0.1 % con leche desnatada en polvo al 5 % durante toda la noche a 4 °C con agitación. El exceso de anticuerpo primario se lavó durante 45 minutos con el tampón PBS-Tween 20 al 0.1 % (tampón de lavado) y posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (anti-IgG HRP para ratón o conejo, en función del anticuerpo primario utilizado) durante 1 hora (Tabla 3). El exceso de anticuerpo secundario se retiró mediante sucesivos lavados en tampón de lavado y posteriormente se procedió al revelado mediante el kit comercial ECL (Amersham Life Sciences, Barcelona, España) en películas Kodak. Como control de carga de proteína, las membranas fueron expuestas al anticuerpo primario,  $\alpha$ -actina. La densidad del marcaje inmunorreactivo de las bandas se analizó con un software específico denominado ImageJ.

### 2.5.2. Determinación del grado de fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC<sub>20</sub>) y de la subunidad reguladora de la fosfatasa (MYPT)

Para la determinación de la fosforilación de la cadena reguladora de la miosina (MLC<sub>20</sub>) y de la subunidad reguladora de la fosfatasa de la miosina (MYPT) se emplearon arterias peneanas y cuerpo cavernoso de ratas Wistar Kioto. Una vez estimuladas fueron congeladas inmediatamente en un tubo eppendorf con 500 µL de acetona a 4 °C con ácido tricloroacético (10 %) y ditioteitrol (10 mM) y almacenadas a -20 °C durante toda la noche. A continuación, se lavaron tres veces en una solución con acetona y ditioteitrol (10 mM). Tanto las arterias como los cuerpos cavernosos fueron homogeneizadas individual y directamente en el tampón lisis/muestra (1:1), y posteriormente sometidas a 50 °C durante 10 minutos con agitación. Una vez sonicadas durante 45 segundos las muestras fueron sometidas a centrifugación (13000 rpm, 10 minutos). La separación de las proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis (45 minutos a 200 V) seguido de la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF. La membrana fue expuesta a los diferentes anticuerpos primarios y secundarios (ver Tablas 2 y 3) y posteriormente se revelaron con el *kit* comercial ECL. La cuantificación de cada una de las bandas: cadena ligera de miosina sin fosforilar (MLC<sub>20</sub>), cadena ligera de miosina fosforilada (P-MYL-9), subunidad reguladora de la fosfatasa sin fosforilar (MYPT) y subunidad reguladora de la fosfatasa fosforilada (P-MYPT) fue realizada por densitometría mediante el software ImageQuant (molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) para su análisis. Los resultados se expresaron como porcentaje de proteína fosforilada dividida por el total de dicha proteína (fosforilada y no fosforilada).

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios empleados

	Diluciones	Animal	Marca comercial
<b><math>\alpha</math>-actina</b>	1:125000	Conejo	Sigma-Aldrich
<b>eNOS</b>	1:200	Ratón	BD Transduction
<b>MLC<sub>20</sub></b>	1:250	Conejo	Cell signalling Biotech.
<b>P-MYL-9</b>	1:100	Conejo	Santa Cruz Biotech.
<b>MYPT</b>	1:2000	Conejo	Santa Cruz Biotech.
<b>P-MYPT (Thr<sup>696</sup>)</b>	1:200	Cabra	Santa Cruz Biotech.
<b>TRPC6</b>	1:200	Conejo	Alomone labs.
<b>RhoK II</b>	1:200	Conejo	Santa Cruz Biotech.

**Tabla 3.** Anticuerpos secundarios empleados

	Anticuerpo utilizado	Diluciones empleadas
<b><math>\alpha</math>-actina</b>	Anti-IgG de conejo	1:2500
<b>eNOS</b>	Anti-IgG de ratón	1:2500
<b>MLC<sub>20</sub></b>	Anti-IgG de conejo	1:4000
<b>P-MYL-9</b>	Anti-IgG de conejo	1:4000
<b>MYPT</b>	Anti-IgG de conejo	1:4000
<b>P-MYPT (Thr<sup>696</sup>)</b>	Anti-IgG de cabra	1:4000
<b>TRPC6</b>	Anti-IgG de conejo	1:4000
<b>RhoK II</b>	Anti-IgG de conejo	1:4000

## 2.6. Inmunohistoquímica

Las muestras de tejido de pene y de corazón conteniendo la arteria dorsal y la arteria coronaria descendente izquierda, respectivamente, de ratas Zucker fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4 % en tampón fosfato (PB) 0.1 M, durante 8 horas a 4 °C. Posteriormente se crioprotegieron con una solución de sacarosa al 30 % en tampón fosfato salino (PBS) con el objeto de evitar la formación de cristales de hielo que pudieran dañar el tejido. A continuación, los bloques de tejido se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de ser cortados. Antes de realizar los cortes histológicos correspondientes, los bloques se dejaron aproximadamente 1 hora en el criostato para que alcanzaran la temperatura óptima para ser cortados como secciones transversales de 10  $\mu$ m de grosor en un criostato. Las secciones se recogieron en portaobjetos gelatinizados que se congelaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

El procedimiento para la determinación de la presencia de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) se realizó según el método de avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (Hsu et al., 1981). Las secciones adheridas a los portaobjetos gelatinizados se sumergieron durante 30 minutos en una mezcla de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1 % y metanol al 90 % en agua destilada con el fin de inhibir la peroxidasa endógena y así evitar posibles interacciones en la reacción. Posteriormente, se lavaron con PBS tres veces cada 10 minutos y preincubadas en suero de cabra al 10 % en PBS y Triton-X-100 al 0.3 % durante 2-3 horas. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario anti-eNOS (dilución 1:500) durante 48 horas a temperatura ambiente con agitación. Transcurrido este tiempo, las secciones permanecieron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado (dilución 1:400) a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el complejo avidina-biotina (vector) (dilución 1:100) durante 90 minutos a temperatura ambiente. El inmunocomplejo resultante se visualizó con 3,3 diaminobenzidina (DAB) al 0.05 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.001 % en PBS. A continuación, las secciones se deshidrataron con alcohol a concentraciones crecientes y xilol, y entonces se cubrieron con medio de montaje DPX y se almacenaron hasta su estudio al microscopio óptico.

## **2.7. Análisis morfométrico**

Las muestras de tejido de pene y miocardio conteniendo la arteria dorsal y la arteria coronaria descendente izquierda, respectivamente, de ratas Zucker se fijaron y crioprotegieron como se ha descrito en el apartado 2.6. La determinación morfométrica del área de la capa media y del área total del vaso se realizó usando el programa informático Metamorph 4.0. Todas las imágenes fueron obtenidas a partir de las secciones transversales de muestras de tejido, sometidas a tinción de hematoxilina-eosina para calcular posteriormente las diferentes áreas. La determinación del área luminal, se calculó a partir del área de la sección cruzada delimitada por la lámina elástica interna y se corrigió a un círculo, aplicando el factor de corrección  $l^2/4\pi$ , donde  $l$  es la longitud de la lámina. El área de la capa media se calculó a partir de la diferencia entre el



área total y luminal del vaso. Este método evita errores en los cálculos que puedan ser causados por un colapso eventual de los segmentos arteriales, debido a la fijación por inmersión del tejido (Bonthu et al, 1997). A partir de las áreas vascular total y luminal, se determinaron los diámetros externo e interno de las arterias, respectivamente, y el grosor de la capa media como diferencia de los dos valores anteriores. Los datos que se muestran en los resultados son la media estadística de los obtenidos a partir de las medidas de tres secciones diferentes de un mismo segmento arterial de animales LZR y OZR. Se usaron una arteria coronaria y dos arterias dorsales peneanas por animal.

## 2.8. Cálculos y análisis de los resultados

Las respuestas mecánicas de los vasos se expresan como tensión activa, es decir, el incremento de la fuerza ( $\Delta F$ , mN) registrada dividido por dos veces la longitud del segmento arterial ( $a$ , mm):

$$\Delta T = \Delta F / 2a$$

o como la presión transmural ( $\Delta P$ , mmHg):

$$\Delta P = \frac{2000 \times \Delta T}{0.9 \times L_{100}}$$

La sensibilidad de los agonistas contráctiles se expresa en términos de concentración eficaz 50 ( $CE_{50}$ ), que se define como la concentración del agonista que origina el 50% del efecto máximo,  $E_{m\acute{a}x}$ . El  $pD_2$  es el valor negativo del logaritmo de la  $EC_{50}$ :  $pD_2 = -\log [CE_{50}]$ .

La contracción máxima de los agonistas es expresada en valores absolutos ( $Nm^{-1}$ ) o relativos, como porcentaje de la respuesta contráctil máxima inducida por un agonista en cada arteria o porcentaje del KPSS.

La  $EC_{50}$  fue estimada determinando el ajuste ("fitting") de la respuesta del vaso según la ecuación de Hill:

$$R = \frac{R_{m\acute{a}x} \times A(M)^n}{A(M)^n + CE_{50}(M)^n}$$

Donde  $R$  es la respuesta máxima del vaso para la concentración  $A(M)$  del agonista;  $R_{\text{máx}}$  es la respuesta máxima del vaso para el agonista y  $n$  es un parámetro de ajuste de la curva o “Coeficiente de Hill”. El ajuste a la ecuación fue realizado con el programa informático GraphPad Prism 5.0. Las diferencias de estimar la  $CE_{50}$  por interpolación frente al ajuste de una curva son insignificantes, pero la ventaja de usar el ajuste no-lineal es la posibilidad de estimar el Coeficiente de Hill que puede dar la información sobre el carácter de la respuesta del vaso.

Todos los resultados se expresan bien en valores absolutos como  $Nm^{-1}$  de tensión activa o como porcentaje de la respuesta máxima del agonista o del KPSS, en forma de media  $\pm$  el error estándar medio (E.S.M.). La evaluación estadística de las diferencias entre medias se ha realizado utilizando el test estadístico de la *t de Student* para observaciones pareadas o no pareadas, según el caso. La evaluación de las diferencias significativas entre medias de diversos grupos se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de un *Test de Bonferroni* como post-test. Un nivel de probabilidad inferior a un 5% ( $P < 0.05$ ) fue considerado significativo.



## **IV. RESULTADOS**



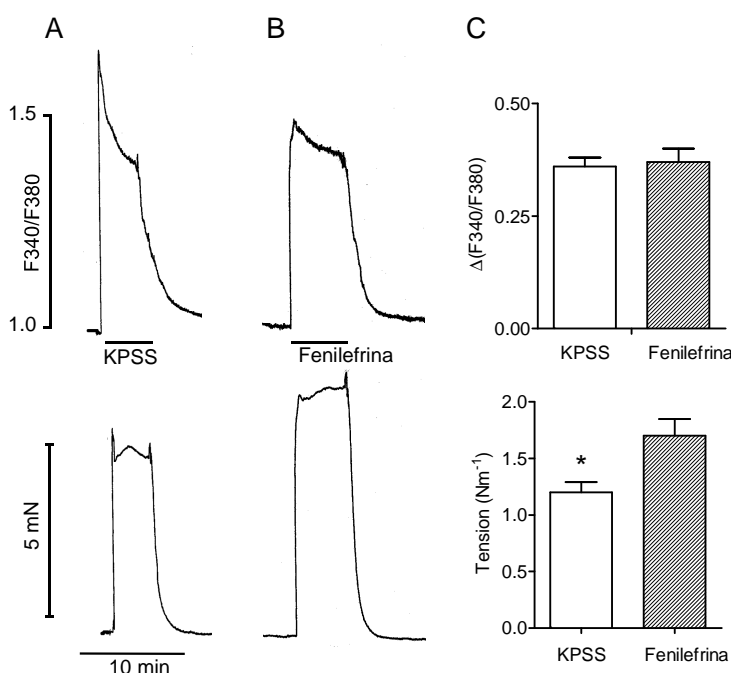
## 1. MECANISMOS DE ENTRADA DE $\text{Ca}^{2+}$ Y DE SENSIBILIZACIÓN AL $\text{Ca}^{2+}$ IMPLICADOS EN LA VASOCONSTRICCIÓN $\alpha_1$ -ADRENÉRGICA DE LAS ARTERIAS PENEANAS

### 1.1. Contribución de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ y de los depósitos intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ a la vasoconstricción $\alpha_1$ -adrenérgica

#### 1.1.1. Efecto de la despolarización y de la activación del receptor $\alpha_1$ -adrenérgico sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la tensión

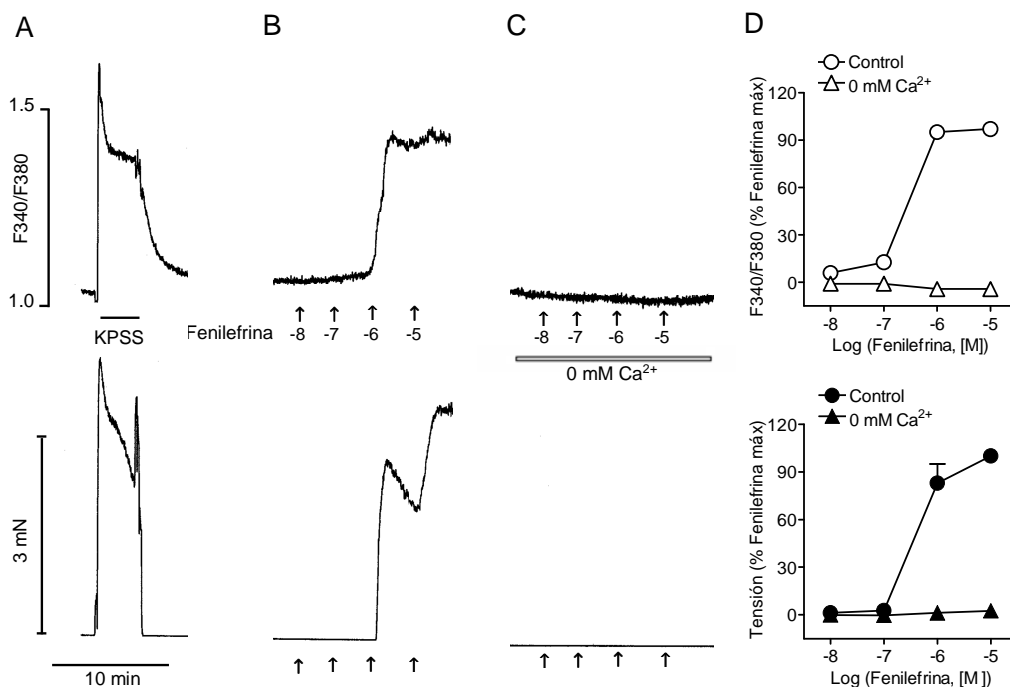
La despolarización con una solución rica en  $\text{K}^+$  (KPSS) indujo un incremento tanto de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como de la tensión que consistió en un pico inicial rápido seguido de una segunda fase sostenida (Figura 9A y C). El agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina también provocó un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  con valores de las partes fásica y sostenida (5 min) de la respuesta de  $116 \pm 2 \%$  y  $101 \pm 4 \%$ , respectivamente de la respuesta inducida por el KPSS (Figura 9B y C). Sin embargo, la fenilefrina provocó un incremento sostenido en la tensión que resultó significativamente mayor ( $142 \pm 4 \%$ ,  $n = 8$ ,  $P < 0.01$ ) que el inducido por el KPSS para un mismo nivel de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figura 9C). Estos datos iniciales indican que la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico en las arterias peneanas induce tanto una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  como mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Figura 9. La despolarización inducida por KPSS y la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico elevan tanto la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como en la tensión en las arterias peneanas de la rata. (A) Medidas simultáneas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (arriba) y tensión (abajo) inducidos por una solución despolarizante ( $\text{K}^+$  125 mM, KPSS) y (B) 3  $\mu\text{M}$  fenilefrina. C: Resumen de los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (arriba) y en la tensión (abajo) en respuesta a la adición de KPSS y fenilefrina. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 8 arterias. \* $P < 0.05$ .**



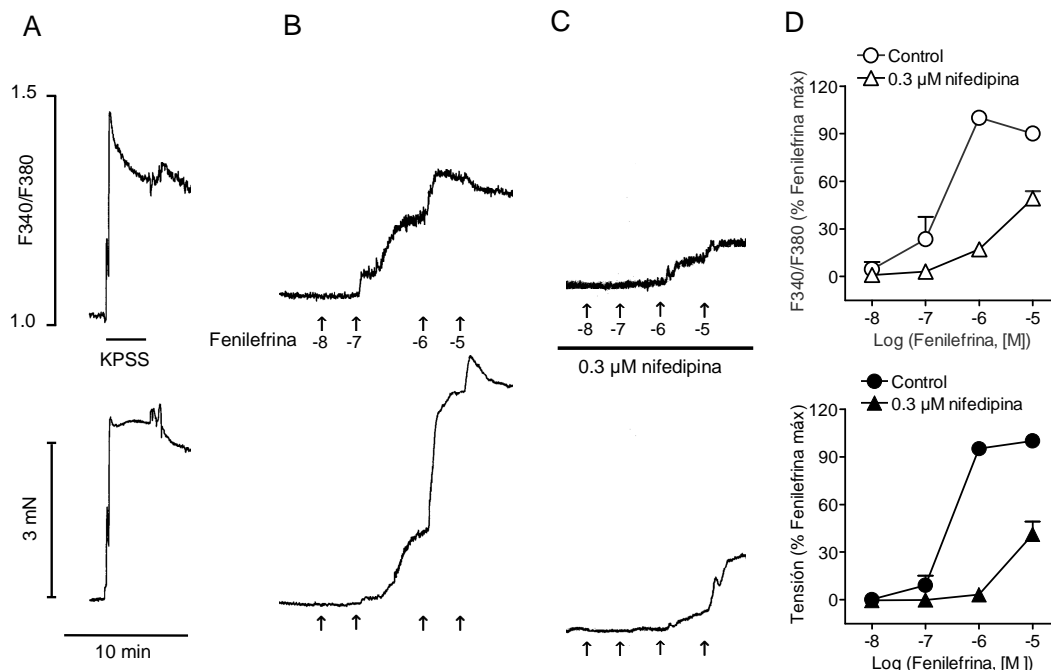
### 1.1.2. Papel del $\text{Ca}^{2+}$ extracelular en los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de la contracción inducidos por fenilefrina

Con objeto de estudiar el papel de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta contráctil inducida por el agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina, se realizaron CCR para este agonista ( $10^{-8}$  M –  $10^{-5}$  M) en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Después de la primera CCR, las arterias se incubaron en una solución libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0.1 mM EGTA) y posteriormente se mantuvieron en PSS *nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$*  (0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0 mM EGTA), realizándose bajo estas condiciones una segunda CCR. El cambio de la solución salina fisiológica a la solución *nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$*  redujo significativamente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal en un  $18 \pm 3$  % de la respuesta del KPSS, sin alterar significativamente la tensión basal. La retirada del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular anuló el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por la adición acumulativa de fenilefrina y redujo la tensión a un  $2 \pm 1$  % ( $n = 4$ ) de la respuesta máxima control (Figura 10).



Con el fin de determinar la contribución de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la contracción inducida por la fenilefrina, se utilizó nifedipina ( $0.3 \mu\text{M}$ ). Este agente redujo la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a un  $49 \pm 4 \%$  y la tensión un  $41 \pm 8 \%$  de la respuesta máxima producida por la fenilefrina (Figura 11).

La participación de otros canales de cationes de diferentes de los del tipo L en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se estudió con el antagonista no selectivo de canales ROC/SOC SKF96365. Este agente redujo completamente y de manera dependiente de la concentración la contracción inducida por la fenilefrina ( $\text{pCl}_{50}$   $4.35 \pm 0.46$ ,  $n = 6$ ), pero igualmente inhibió la contracción inducida por KPSS con una potencia mayor que la mostrada para la fenilefrina ( $\text{pCl}_{50}$   $5.48 \pm 0.01$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). El 2-APB, tradicionalmente usado como antagonista de los receptores de  $\text{InsP}_3$  y antagonista de los canales SOC, tuvo un efecto inhibitor dependiente de la concentración sobre la respuesta inducida por la fenilefrina, pero a altas concentraciones también inhibió la vasoconstricción inducida por despolarización por KPSS ( $58 \pm 6 \%$ ,  $n = 4$ ).

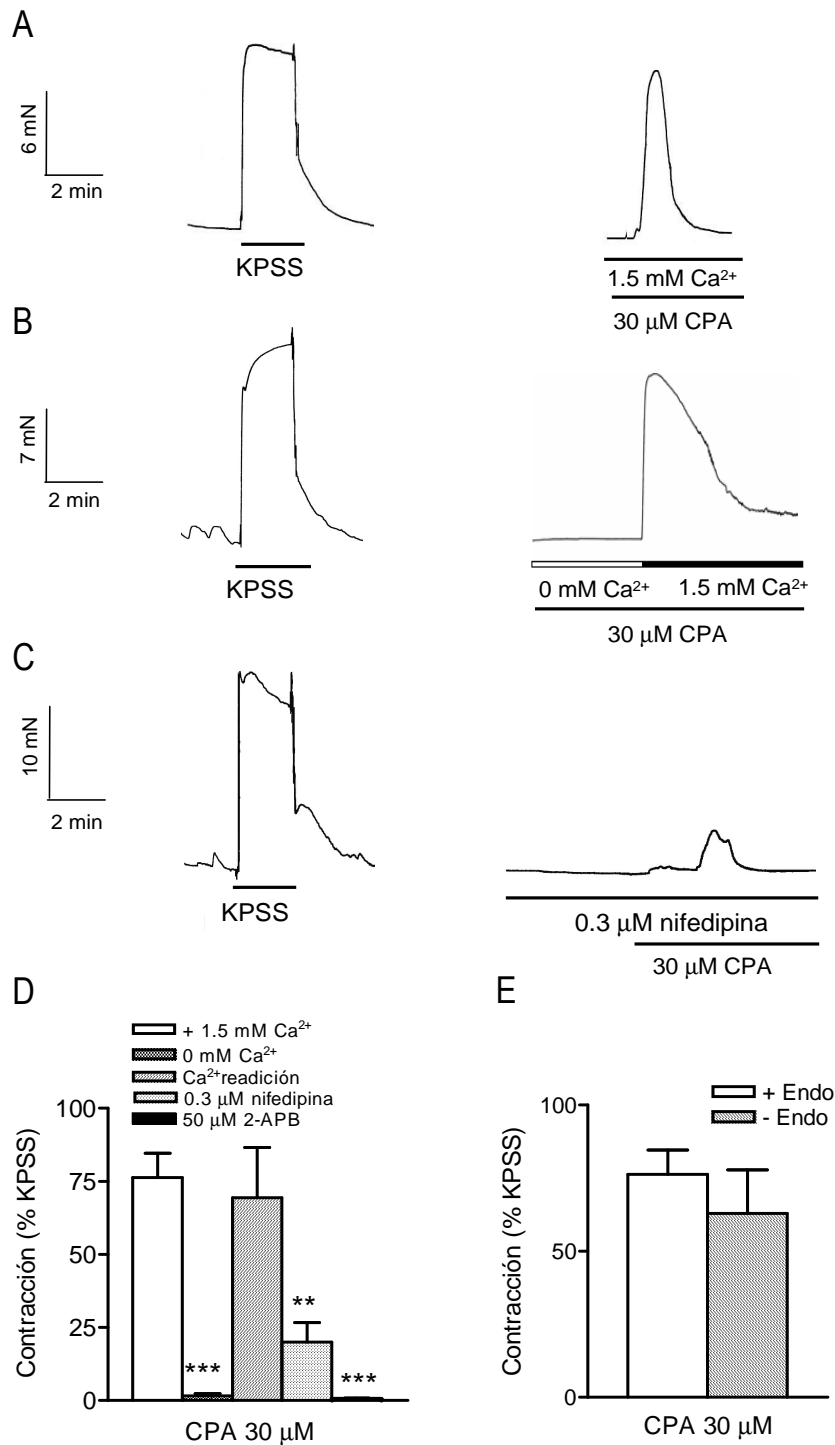




### 1.1.3. Efecto del vaciamiento de los depósitos intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ con CPA sobre la tensión

Los efectos del bloqueo de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico se evaluaron con ácido ciclopiazónico (CPA) sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la tensión. El ácido ciclopiazónico (30  $\mu\text{M}$ ) provocó una contracción variable, no reproducible (después de 1 hora) y reversible con los lavados. Dicha contracción se produjo en 14 de 22 arterias con endotelio intacto y fue un  $76 \pm 8$  % del KPSS (Figura 12). Además fue abolida cuando se procedió a la retirada del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ( $1 \pm 1$  % del KPSS,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ ) y restaurada tras la readición de  $\text{Ca}^{2+}$  al baño en la presencia de ácido ciclopiazónico a un  $78 \pm 15$  % del KPSS ( $n = 7$ ) (Figura 12B y D). El antagonista putativo de los canales SOC, 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ) y la nifedipina (0.3  $\mu\text{M}$ ) redujeron la respuesta contráctil del ácido ciclopiazónico a un  $0.6 \pm 0.2$  % y a un  $20 \pm 7$  % del KPSS ( $P < 0.01$ ,  $n = 6$ ), respectivamente (Figura 12C y D).

Estos datos sugieren que la respuesta contráctil inducida por el ácido ciclopiazónico requiere la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales SOC y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje del tipo L. El efecto contráctil del ácido ciclopiazónico no fue dependiente del endotelio y así, este agente contrajo un  $63 \pm 15$  % del KPSS en 9 de 12 arterias sin endotelio en las cuales la relajación de la acetilcolina (10  $\mu\text{M}$ ) fue reducida de un  $61 \pm 12$  % a un  $6 \pm 3$  % ( $P < 0.05$ ) de la precontracción después de la retirada mecánica del endotelio vascular.

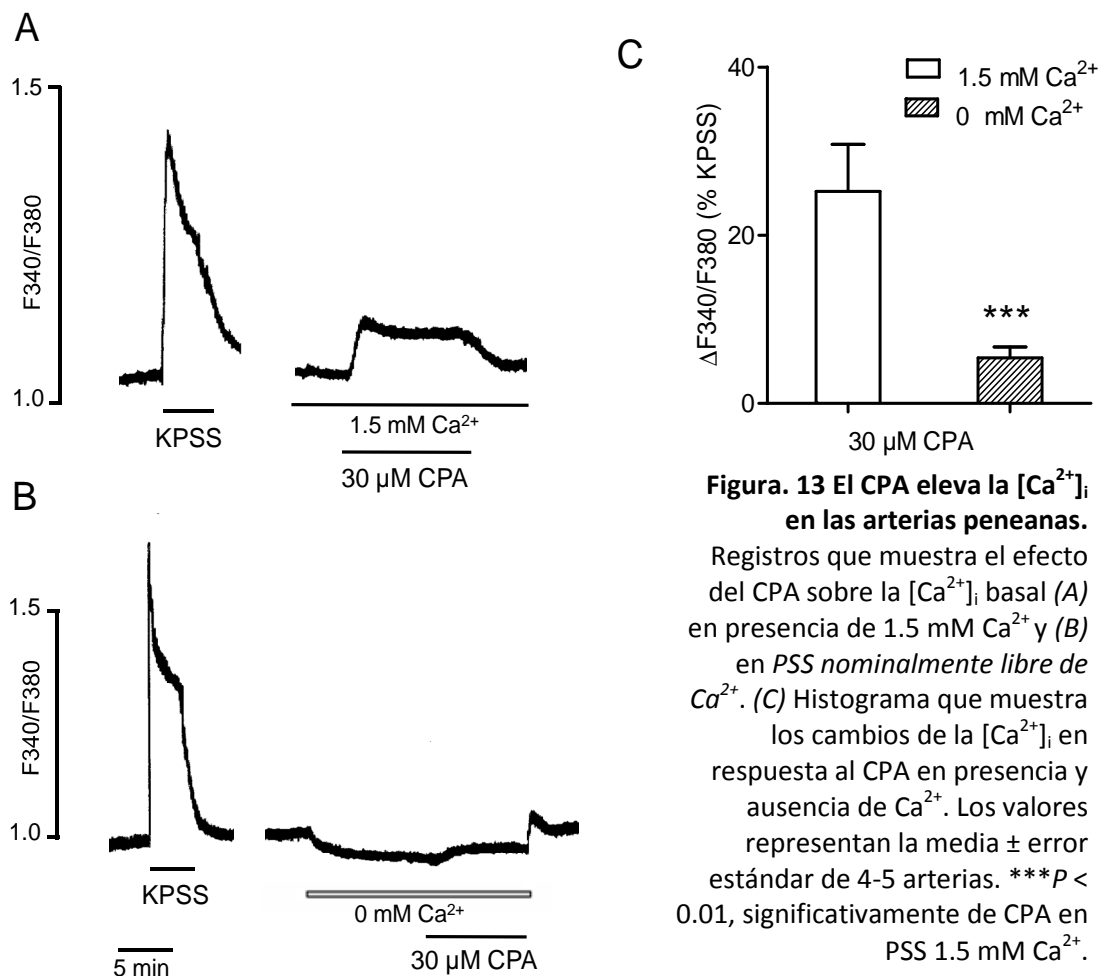


**Figura 12. El ácido ciclopiazónico (CPA) induce contracciones dependientes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.** Registros representativos del efecto contráctil de CPA (30 μM) en (A) PSS 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (B) PSS nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y tras la readición de 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (C) en presencia de nifedipina (0.3 μM). (D) Histograma que muestra la contracción producida por el CPA bajo diferentes condiciones. (E) Respuesta contráctil media inducida por el CPA en arterias provistas y desprovistas de endotelio. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5-22 arterias. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , significativamente diferente de la contracción inducida por el CPA.

#### 1.1.4. Efecto del vaciamiento de los depósitos intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ con CPA sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

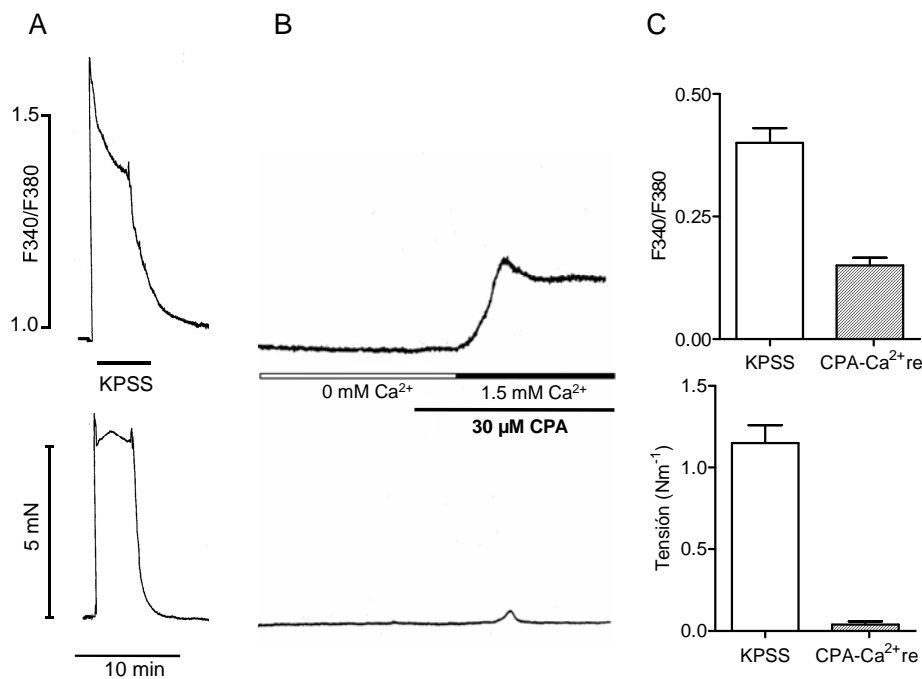
En arterias peneanas desprovistas de endotelio, la adición de ácido ciclopiazónico (30  $\mu\text{M}$ ) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (1.5 mM) provocó un incremento sostenido de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\Delta(\text{F340}/\text{F380})$  de  $0.09 \pm 0.01$ ,  $n = 5$ ) que representó un  $24 \pm 4 \%$  del KPSS ( $n = 4$ ), acompañado de una contracción del  $11 \pm 5 \%$  de la inducida por KPSS ( $n = 5$ ). El incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por el ácido ciclopiazónico se redujo a un  $5 \pm 2 \%$  del KPSS ( $n = 4$ ) en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Figura 13). Este pequeño incremento refleja la escasa participación del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo sarcoplásmico en la contracción del lecho arterial peneano.

La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  (1.5 mM) posterior a la incubación de las arterias con ácido ciclopiazónico en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y bajo condiciones de bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L con nifedipina (0.3  $\mu\text{M}$ ) causó un incremento sostenido de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de un  $37 \pm 5 \%$  del KPSS ( $n = 4$ ), lo que sugiere una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  *capacitativa* a través de canales SOC.

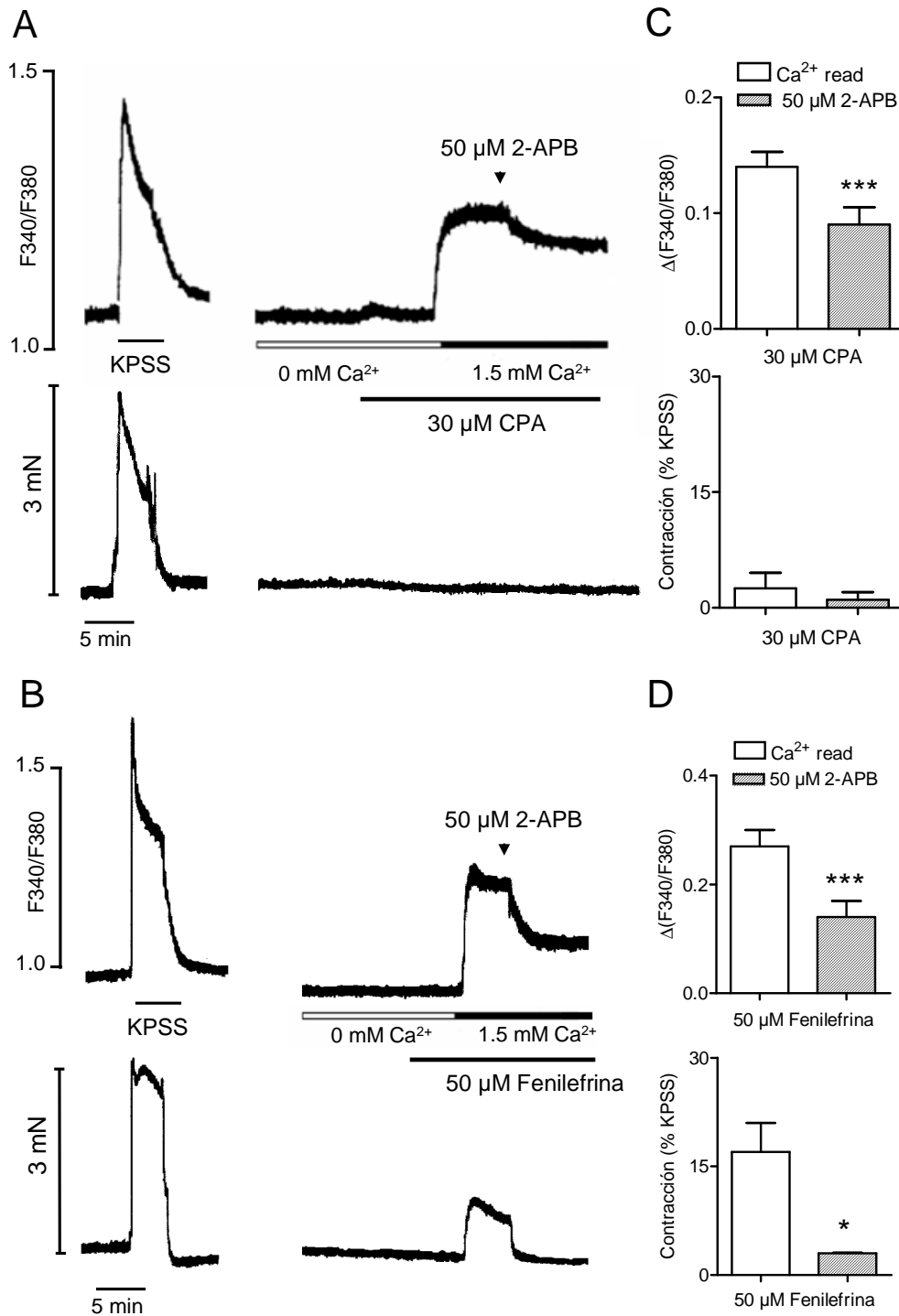


**Figura. 13 El CPA eleva la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las arterias peneanas.** Registros que muestra el efecto del CPA sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal (A) en presencia de 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  y (B) en PSS nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . (C) Histograma que muestra los cambios de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta al CPA en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4-5 arterias. \*\*\* $P < 0.01$ , significativamente de CPA en PSS 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

Sin embargo, el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en estas condiciones no fue acompañado por un desarrollo de tensión ( $4 \pm 2$  % KPSS,  $n = 4$ ) (Figura 14B y C) indicando que esta entrada *capacitativa* no está acoplada a la contracción en las arterias peneanas de la rata. La implicación de los canales SOC en la entrada de  $Ca^{2+}$  inducida por el vaciamiento del retículo sarcoplásmico con ácido ciclopiazónico fue investigada usando 2-APB bajo condiciones de bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L con nifedipina ( $0.3 \mu M$ ) (Figura 15). El 2-APB redujo en un  $36 \pm 5$  % ( $n = 4$ ) la entrada de  $Ca^{2+}$  resistente a nifedipina inducida por el vaciamiento de los depósitos de  $Ca^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico con ácido ciclopiazónico (Figura 15A y C). Además, el 2-APB ( $50 \mu M$ ) redujo tanto la entrada de  $Ca^{2+}$  como la contracción resistentes a nifedipina causadas por la fenilefrina ( $50 \mu M$ ), en un  $47 \pm 5$  % y en un  $77 \pm 3$  % ( $n = 4$ ), respectivamente (Figura 15B y D).



**Figura 14. El vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  con ácido ciclopiazónico (CPA) produce una entrada de  $Ca^{2+}$  no acoplada a la contracción.** Medidas simultáneas de  $[Ca^{2+}]_i$  (arriba) y tensión (abajo) que muestran el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la contracción producidos por (A) una estimulación con KPSS y (B) la readición de 1.5 mM  $Ca^{2+}$  tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares con CPA y bajo condiciones de bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  del tipo L. (C) Histograma que muestra los cambios de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la contracción en respuesta al KPSS y el CPA tras la readición de  $Ca^{2+}$ . Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5 arterias.



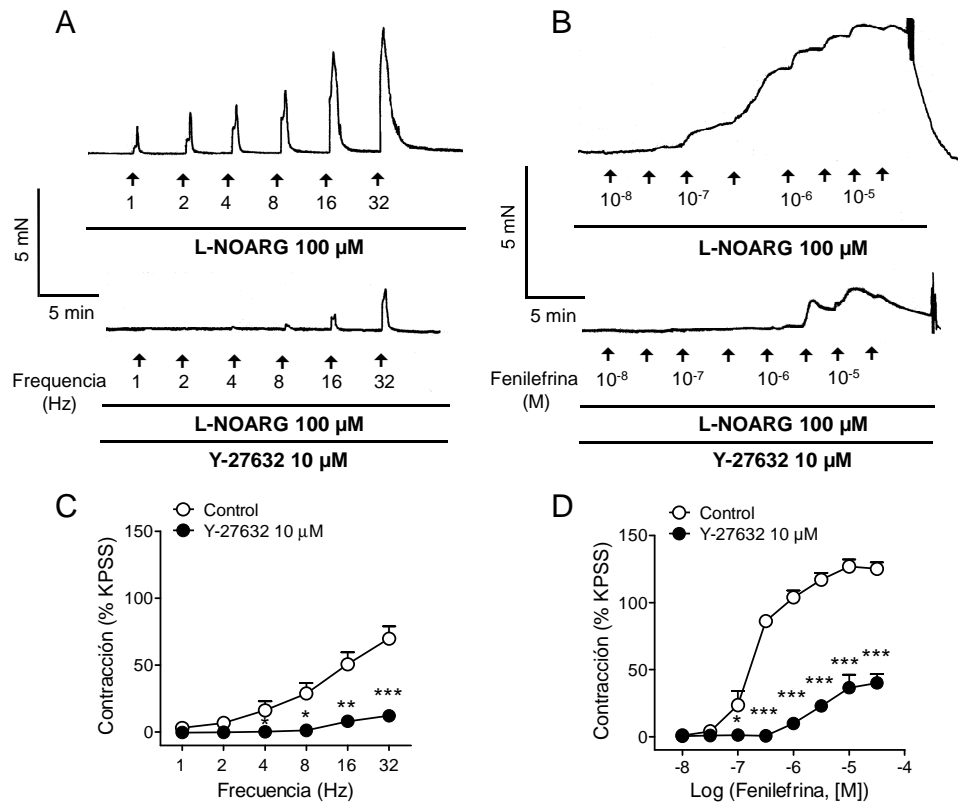
**Figura 15. Efecto del 2-APB sobre la entrada de Ca<sup>2+</sup> inducida por el CPA y por la fenilefrina.** Registros representativos del efecto inhibitor del 2-APB sobre los cambios de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (arriba) y de la tensión (abajo) inducidos por la readición de Ca<sup>2+</sup> tras el tratamiento con (A) CPA y (B) 30  $\mu$ M fenilefrina (C y D) Resumen de los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (arriba) y en la tensión (abajo) en respuesta a la adición de 2-APB (50  $\mu$ M). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4 arterias. \* $P$  < 0.05; \*\*\* $P$  < 0.01.

## 1.2. Papel de RhoK en la regulación de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ activada por fenilefrina

### 1.2.1. Efecto de la inhibición de RhoK sobre las contracciones inducidas por la EET y por la activación del receptor $\alpha_1$ -adrenérgico

La EET se llevó a cabo sobre el tono basal de arterias peneanas de un diámetro de  $134 \pm 11 \mu\text{m}$  ( $n = 7$ ) en la presencia de L-NOARG ( $100 \mu\text{M}$ ) para inhibir la neurotransmisión nitrérgica, dando lugar a contracciones dependientes de la frecuencia (1-32 Hz) (Figura 16A y C). El inhibidor selectivo de RhoK Y-27632 ( $10 \mu\text{M}$ ) redujo significativamente las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica de los nervios, siendo la máxima respuesta a 32 Hz y alcanzando valores de  $1.16 \pm 0.16$  y  $0.21 \pm 0.06 \text{ Nm}^{-1}$  ( $P < 0.001$ ,  $n = 7$ ) en la presencia y ausencia del inhibidor, respectivamente (Figura 16A y C). Las contracciones producidas por la estimulación eléctrica fueron reproducibles y restauradas a valores control cuando se procedió a la retirada del inhibidor del baño y reducidas a un  $17 \pm 10 \%$  del KPSS por la guanetidina ( $10 \mu\text{M}$ ), confirmando su naturaleza adrenérgica.

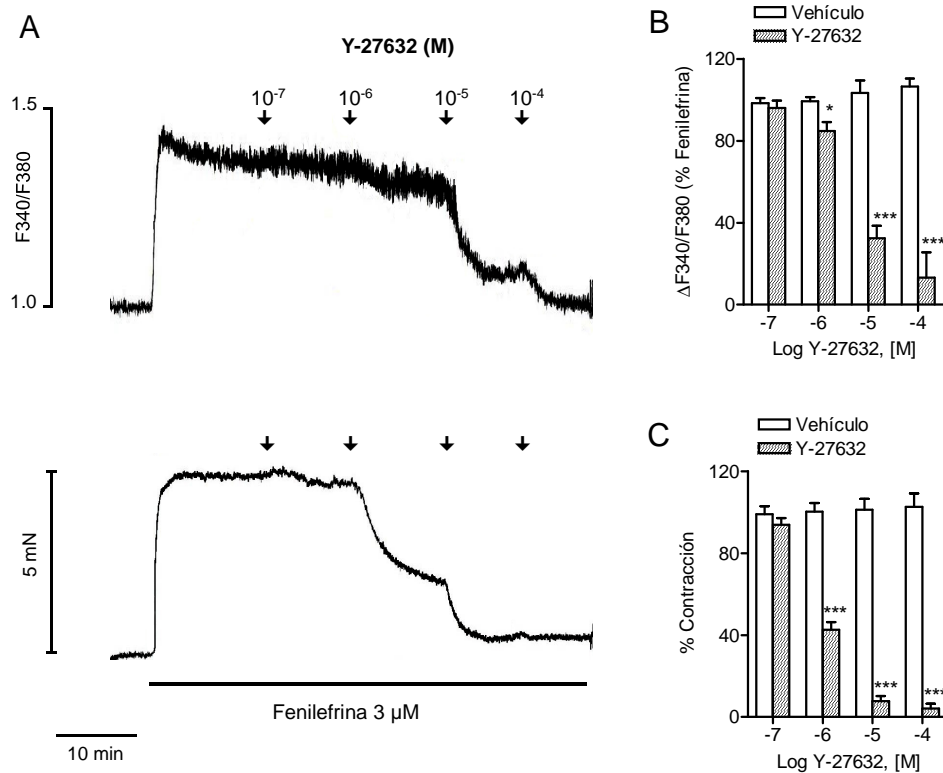
Por otro lado, la adición de manera exógena del agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina ( $0.01$ - $30 \mu\text{M}$ ) provocó contracciones dependientes de la concentración, siendo la respuesta máxima y el valor de  $\text{pCE}_{50}$  de  $1.50 \pm 0.12$  y  $6.54 \pm 0.13 \text{ Nm}^{-1}$  ( $n = 4$ ), respectivamente (Figura 16B y D). El inhibidor Y-27632 ( $10 \mu\text{M}$ ) causó una inhibición marcada de las contracciones inducidas por la fenilefrina, siendo la respuesta máxima y valor de  $\text{pCE}_{50}$  de  $0.47 \pm 0.05$  y  $5.36 \pm 0.21 \text{ Nm}^{-1}$ , respectivamente ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ), después del tratamiento con el inhibidor.



**Figura 16.** El inhibidor de RhoK Y-27632 reduce las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica (EET) y por el agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina en las arterias peneanas. Registro que muestra la respuesta contráctil inducida por (A) la EET y (B) la fenilefrina en ausencia (*arriba*) y en presencia (*abajo*) del inhibidor Y-27632 (10  $\mu$ M). Valores medios del efecto de Y-27632 sobre las contracciones inducidas por (C) la EET y (D) por la fenilefrina. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5-7 arterias. \* $P < 0.1$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , significativamente diferente de la contracción inducida por la fenilefrina en ausencia del inhibidor.

### 1.2.2. Efecto de la inhibición de RhoK sobre los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y la tensión inducidos por la activación del receptor $\alpha_1$ -adrenérgico

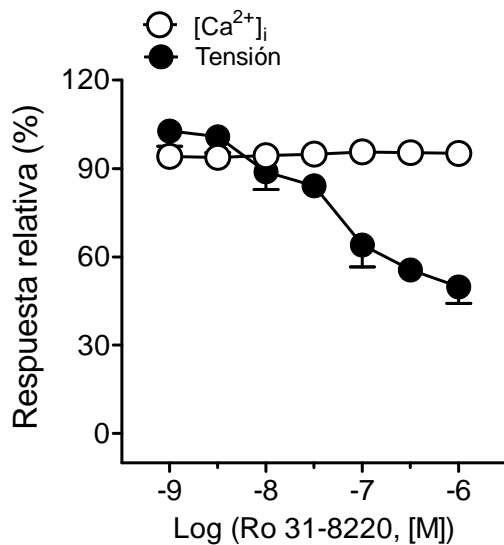
La Figura 17 muestra las medidas simultáneas de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión y los efectos del Y-27632 (0.1-100  $\mu$ M) sobre la precontracción inducida por una dosis submaximal de fenilefrina (3  $\mu$ M). El inhibidor de RhoK redujo significativamente y de manera dependiente de la concentración tanto el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  como en la tensión inducidos por fenilefrina (Figura 17A). El valor de  $pCl_{50}$  para el efecto inhibitor del Y-27632 sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión fue de  $5.44 \pm 0.1$  y  $6.14 \pm 0.06$  ( $n = 5$ ), respectivamente. Estos resultados indican inicialmente que RhoK está implicada tanto en la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular como en la sensibilización al  $Ca^{2+}$  inducida por activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico con fenilefrina.



**Figura 17. El inhibidor de RhoK Y-27632 reduce tanto la  $[Ca^{2+}]_i$  como la contracción inducida por la fenilefrina en las arterias peneanas.** (A) Registro que muestra los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (arriba) y la respuesta contráctil (abajo) inducidos por la adición acumulativa de Y-27632 en arterias precontraídas con fenilefrina (3  $\mu$ M). Valores medios del efecto de Y-27632 que muestra los cambios sobre (B) la  $[Ca^{2+}]_i$  y (C) la tensión. Las respuestas se expresan como porcentaje del incremento en la fluorescencia de las señales de 340- y 380-nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) y la contracción como porcentaje de la precontracción. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4 arterias. \* $P < 0.1$ , \*\*\* $P < 0.001$ , significativamente diferente de la contracción inducida por fenilefrina en ausencia del inhibidor.

Con objeto de descartar posibles efectos del inhibidor Y-27632 sobre otras quinasas además de RhoK y particularmente la PKC, se evaluaron los efectos de un inhibidor selectivo de PKC, Ro31-8220. La Figura 18 muestra el efecto del inhibidor Ro31-8220 sobre arterias precontraídas con fenilefrina (3  $\mu$ M). A diferencia del Y-27632, el inhibidor de la PKC Ro31-8220 produjo una inhibición de la contracción inducida por fenilefrina de manera dependiente de la concentración sin provocar cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 18). El valor de  $pCl_{50}$  para el efecto inhibidor de Ro 31-8220 sobre la tensión fue de  $7.4 \pm 0.14$  ( $n = 4$ ).



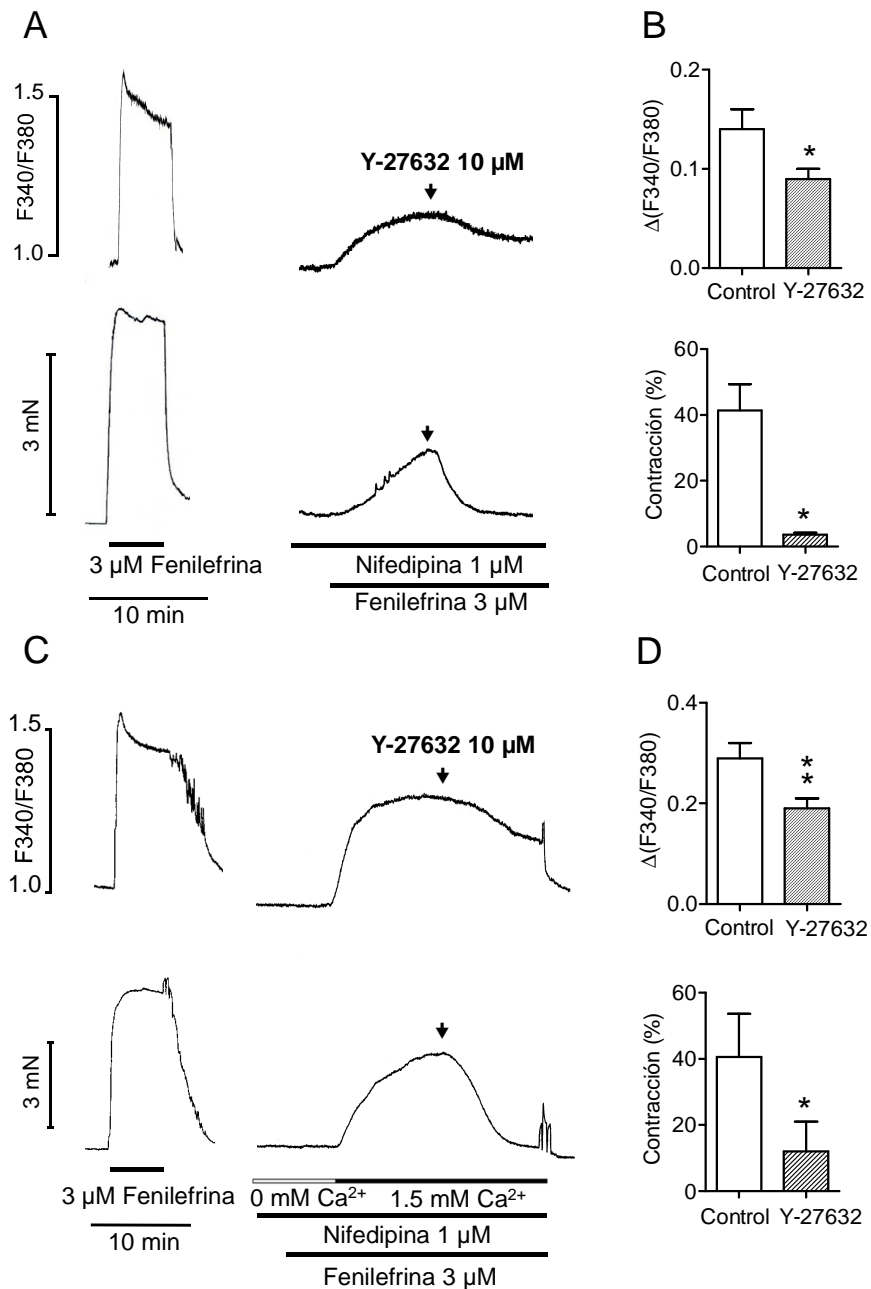


**Figura 18.** El inhibidor de la PKC Ro31-8220 inhibe la vasoconstricción pero no el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por la fenilefrina en las arterias peneanas. Valores medios del efecto de Ro31-8220 sobre los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión. Las respuestas se expresan como porcentaje del incremento en la fluorescencia de las señales de 340- y 380-nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) para la  $[Ca^{2+}]_i$  y la contracción como porcentaje de la precontracción. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4 arterias (1 arteria por animal).

### 1.2.3. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la entrada de $Ca^{2+}$ activada por fenilefrina no mediada por canales de tipo L

Como se ha descrito anteriormente, la vasoconstricción inducida por el agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina en las arterias peneanas, es altamente dependiente de la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular a través tanto de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L como de canales no dependientes de voltaje. Por lo tanto, para investigar que vía de entrada de  $Ca^{2+}$  activada por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico se encuentra regulada por la enzima RhoK, se evaluó el efecto de la inhibición de RhoK sobre los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión inducidos por la fenilefrina bajo condiciones de bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L. Así, en la presencia de nifedipina (1  $\mu$ M), el inhibidor Y-27632 (10  $\mu$ M) redujo parcialmente la entrada de  $Ca^{2+}$  ( $33 \pm 7$  % de inhibición,  $n = 4$ ) y prácticamente abolió la contracción ( $91 \pm 1$  % de inhibición,  $n = 4$ ) inducida por la fenilefrina (10  $\mu$ M) y resistente al bloqueo de los canales de tipo L (Figura 19A y B). Las interacciones entre la vía de RhoK y la entrada de  $Ca^{2+}$  activada por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico se evaluaron también en arterias peneanas incubadas en PSS nominalmente libre de  $Ca^{2+}$  y en presencia de nifedipina (1  $\mu$ M) (Figura 19C y D). En ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, la fenilefrina no afectó ni a la  $[Ca^{2+}]_i$  ni a la tensión, pero cuando el  $Ca^{2+}$  se administró de nuevo en el baño, se produjeron incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión de un  $83 \pm 6$  % y  $40 \pm 13$  % de la respuesta inducida por

la fenilefrina (3  $\mu$ M, Figura 19C). El inhibidor Y-27632 redujo en un  $31 \pm 2$  % y un  $88 \pm 10$  % la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la contracción, respectivamente, inducidos por la fenilefrina (Figura 19C y D).



**Figura 19. El inhibidor Y-27632 reduce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por la fenilefrina resistente al bloqueo de los canales tipo L.** Registro que muestra el efecto del Y-27632 en los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (arriba) y la respuesta contráctil (abajo) inducidos por fenilefrina en presencia de nifedipina en (A) PSS normal y (B) tras la readición de  $\text{Ca}^{2+}$  en arterias mantenidas en PSS nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . (C y D) Valores medios del efecto de Y-27632 sobre los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la tensión inducidos por la fenilefrina. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4-5 arterias. \* $P < 0.1$ , \*\* $P < 0.01$ .

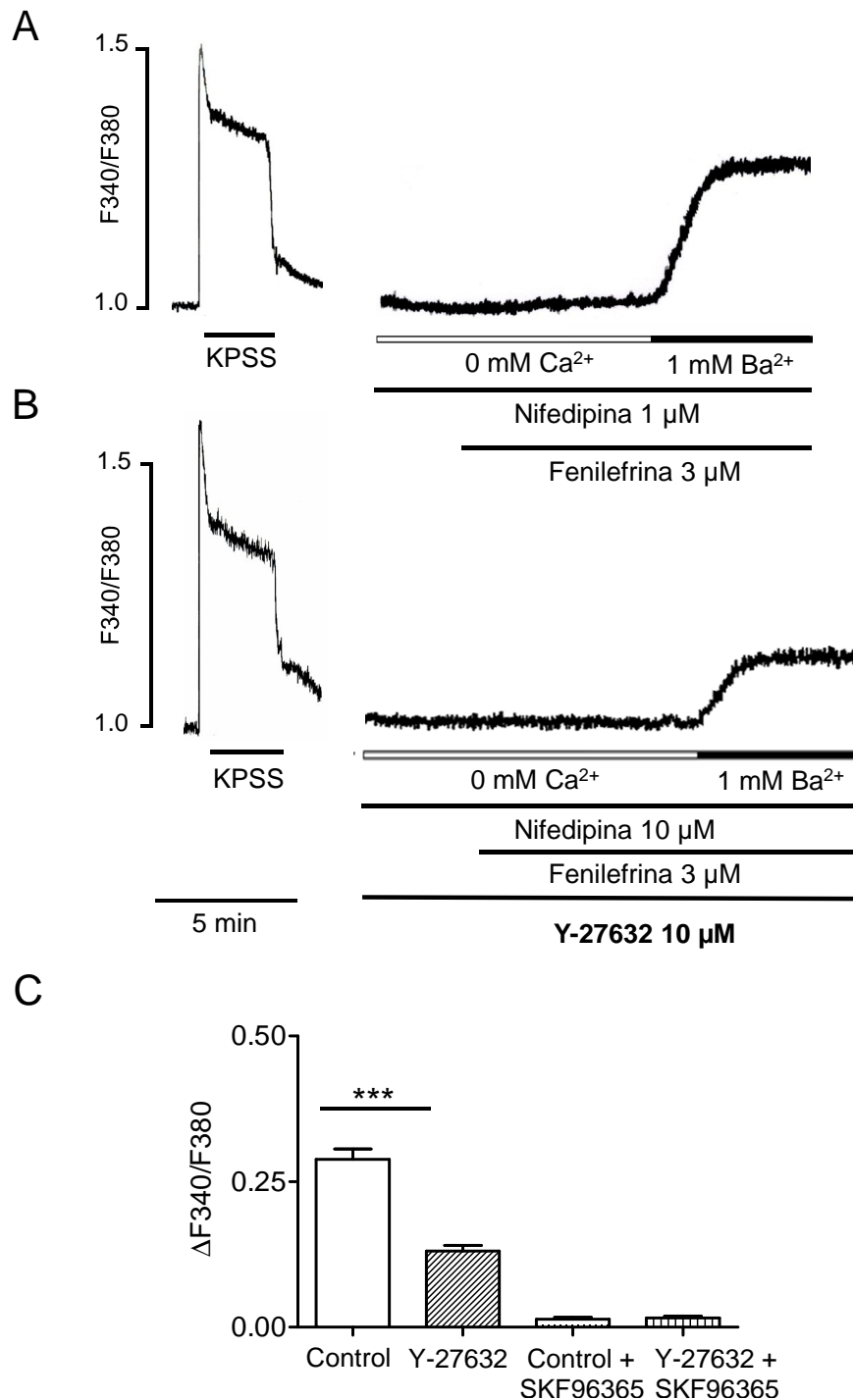
#### 1.2.4. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la entrada de $Ba^{2+}$ activada por fenilefrina

La contribución de los canales de cationes no selectivos a la entrada de  $Ca^{2+}$  asociada a la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico se evaluó usando fluorimetría de  $Ba^{2+}$  en lugar de  $Ca^{2+}$  con el objeto de investigar la entrada de cationes divalentes activados por fenilefrina sin la intervención de mecanismos de extrusión de  $Ca^{2+}$  ni de almacenamiento del mismo en los depósitos intracelulares (Inoue et al., 2001). Las arterias peneanas se mantuvieron en *PSS nominalmente libre de  $Ca^{2+}$*  y se incubaron con nifedipina (1  $\mu$ M) con el objeto de bloquear los canales dependientes de voltaje, y bajo estas condiciones se estimularon con fenilefrina (3  $\mu$ M). Como muestra la Figura 20A y B y se resume en la Figura 20C, la adición de  $Ba^{2+}$  (1 mM) al baño incrementó el ratio fura 2-AM hasta  $0.28 \pm 0.018$  ( $69.6 \pm 5$  % del KPSS,  $n = 7$ ). El tratamiento con Y-27632 redujo significativamente el incremento en la fluorescencia debida a  $Ba^{2+}$  en respuesta a la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico en un  $0.13 \pm 0.01$  ( $39.5 \pm 6$  % del KPSS,  $n = 7$ ,  $P < 0.001$ ). El SKF96365 (100  $\mu$ M), un bloqueante de canales de cationes no selectivo que se utilizó como control positivo, abolió la entrada de  $Ba^{2+}$  activada por la fenilefrina en arterias control y en arterias tratadas con Y-27632 ( $\Delta F340/F380$  de  $0.01 \pm 0.01$  y  $0.02 \pm 0.01$ , respectivamente,  $n = 3$ , después del tratamiento con SKF96365).

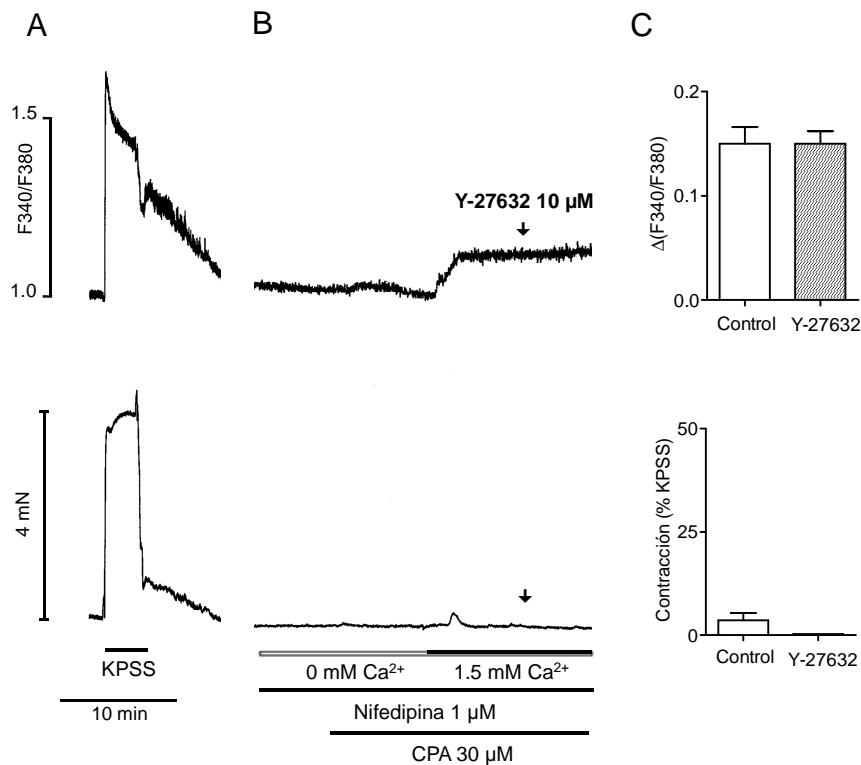
#### 1.2.5. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la entrada de capacitativa de $Ca^{2+}$

El posible papel de RhoK en la regulación de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales SOC se evaluó mediante el efecto del Y-27632 sobre la entrada de  $Ca^{2+}$  activada por el vaciamiento de los depósitos de  $Ca^{2+}$  intracelulares con ácido ciclopiazónico bajo condiciones de bloqueo de los canales operados por voltaje tipo L con nifedipina. La readición de  $Ca^{2+}$  en arterias tratadas con ácido ciclopiazónico (30  $\mu$ M) en un medio libre de  $Ca^{2+}$  en presencia de nifedipina (1  $\mu$ M), provocó un incremento sostenido en la  $[Ca^{2+}]_i$  que no estuvo acoplada a la contracción ( $3 \pm 1$  % KPSS,  $n = 4$ ) (Figura 21B). La adición de Y-27632 (10  $\mu$ M) no afectó la entrada de  $Ca^{2+}$  debida al vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  con ácido ciclopiazónico siendo la señal de  $Ca^{2+}$  en

ausencia y presencia del inhibidor un  $37 \pm 5 \%$  y  $37 \pm 4 \%$  del KPSS ( $n = 5$ ), respectivamente (Figura 21B y C).



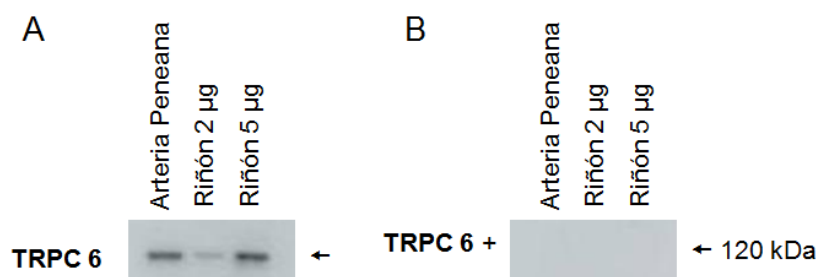
**Figura 20. El inhibidor Y-27632 reduce la entrada de Ba<sup>2+</sup> activada por la fenilefrina en las arterias peneanas.** Registro que muestra la entrada de Ba<sup>2+</sup> activada por fenilefrina en condiciones control (A) y en presencia de Y-27632 (B). (C) Valores medios de cambio en F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub> tras la adición de Ba<sup>2+</sup> en presencia de Y-27632 y SKF96365. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4-7 arterias (1 arteria por animal). \*\*\* $P < 0.001$ , significativamente diferente de la contracción inducida por la fenilefrina en ausencia del inhibidor.



**Figura 21. El inhibidor Y-27632 no altera la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa activada por el ácido ciclopiazónico (CPA).** (A y B) Registro que muestra los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (arriba) y en la respuesta contráctil (abajo) inducidos por (A) KPSS y (B) Y-27632 sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por la readición de  $\text{Ca}^{2+}$  tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  con CPA en presencia de nifedipina. (C) Valores medios del efecto de Y-27632 sobre los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (arriba) y la tensión (abajo). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4 arterias (1 arteria por animal).

#### 1.2.6. Identificación de la expresión del canal TRP6 mediante Western blotting

Con objeto de determinar la presencia de los canales TRP del subtipo 6 en el lecho arterial peneano, se utilizaron ensayos de Western blotting en extractos de proteína total de la arteria dorsal peneana y en homogenados de riñón (este último como control positivo) como se describe en el Apartado 2.5.1. de Material y Métodos, utilizando un anticuerpo anti-TRPC6. Los resultados aparecen en la Figura 22, donde se muestra la expresión de dichos canales en la arteria dorsal. En presencia del péptido de bloqueo no se obtuvieron bandas para dicha proteína.



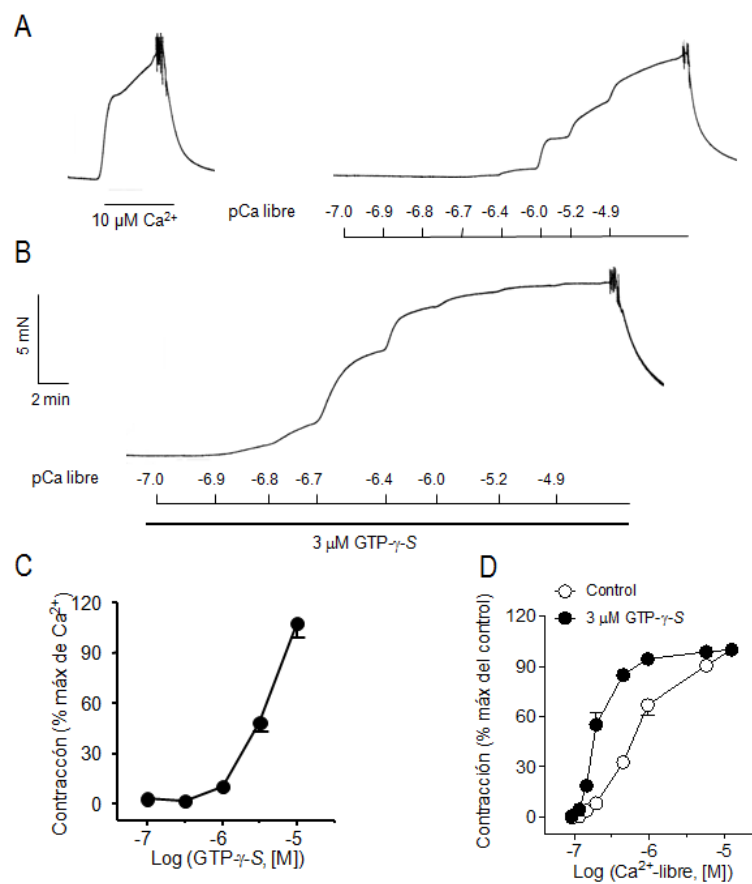
**Figura 22. Presencia de los canales TRP del subtipo 6 en las arterias peneanas.** Homogenados de la arteria dorsal peneana y de riñón fueron sometidos a electroforesis (SDS-PAGE) e inmunotransferencia utilizando un anticuerpo específico para la proteína TRPC6 (A). Los controles negativos se obtuvieron mediante la incubación con el péptido apropiado previo a la incubación con el anticuerpo primario anti-TRPC6 (B).

### 1.3. Mecanismos de sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ acoplados a la activación del receptor $\alpha_1$ -adrenérgico

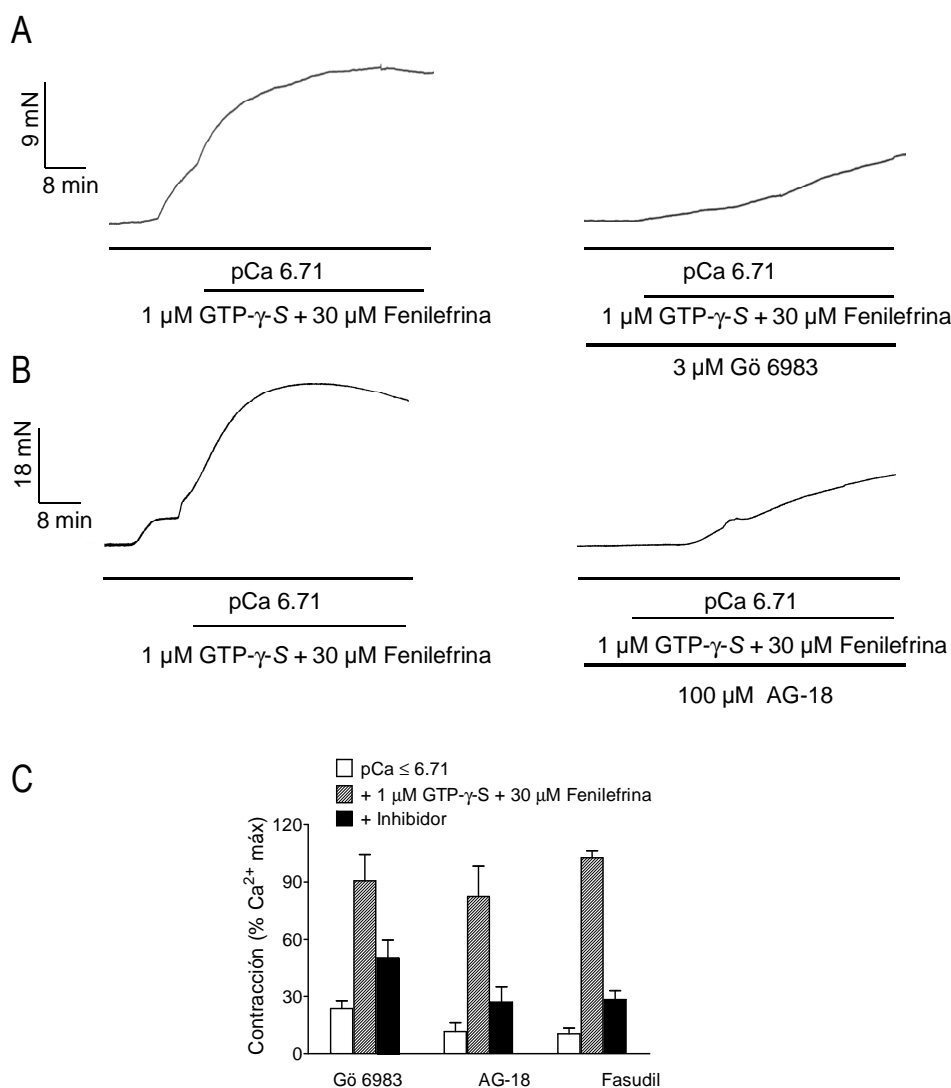
#### 1.3.1. Sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ del aparato contráctil en arterias permeabilizadas con $\alpha$ -toxina

La contribución de los mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en la vasoconstricción arterial peneana se evaluó en arterias peneanas permeabilizadas con  $\alpha$ -toxina. En 14 arterias permeabilizadas de un diámetro interno normalizado de  $182 \pm 7 \mu\text{m}$ , la estimulación con una concentración maximal de  $\text{Ca}^{2+}$  libre ( $10 \mu\text{M}$ ) provocó una contracción sostenida de  $1.86 \pm 0.2 \text{ Nm}^{-1}$  ( $n = 14$ , Figura 23A). La sensibilización de la maquinaria contráctil al  $\text{Ca}^{2+}$  y su modulación por receptores acoplados a proteínas G se investigó usando GTP- $\gamma$ -S, un análogo no hidrolizable de GTP que provoca una activación irreversible de las proteínas G. El efecto dependiente de la concentración del GTP- $\gamma$ -S observado indica que a la concentración de  $3 \mu\text{M}$  este agente causa una sensibilización media máxima de la contracción ( $\text{pCE}_{50} 5.35 \pm 0.1$ ,  $n = 4$ ) correspondiente a unas tres veces la alcanzada a un  $\text{pCa}$  de 6.84 (Figura 23C). Esta concentración de GTP- $\gamma$ -S fue seleccionada posteriormente para evaluar sus efectos sobre las relaciones  $\text{pCa}$ -tensión que se realizaron en arterias permeabilizadas. En ausencia de GTP- $\gamma$ -S, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $< 100 \text{ nM} - 10 \mu\text{M}$ ) provocó contracciones de gran magnitud dependientes de la concentración, con un  $\text{pCE}_{50}$  y una respuesta máxima de  $6.20 \pm 0.05$  y  $2.47 \pm 0.19 \text{ Nm}^{-1}$  ( $n = 4$ ), respectivamente (Figura 23A). La incubación con  $3 \mu\text{M}$  GTP- $\gamma$ -S incrementó 3.3 veces la sensibilidad de las curvas de  $\text{Ca}^{2+}$  sin alterar la

respuesta contráctil máxima (los valores de  $pCE_{50}$  y respuesta máxima fueron de  $6.71 \pm 0.04$ ,  $n = 4$ ,  $P < 0.01$ , y de  $2.88 \pm 0.26 \text{ Nm}^{-1}$ , no significativo,  $n = 4$ , respectivamente) (Figura 23B y D). La contribución de la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  producida por activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico se evaluó en arterias permeabilizadas usando una dosis de umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $p\text{Ca} \leq 6.71$ ) que produjo una contracción  $\leq 20\%$  de la contracción máxima inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , bajo la estimulación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico con fenilefrina ( $30 \mu\text{M}$ ) y en presencia de  $1 \mu\text{M}$  GTP- $\gamma$ -S. Bajo estas condiciones, la fenilefrina incrementó la contracción inducida por una dosis umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $0.24 \pm 0.05 \text{ Nm}^{-1}$  y  $1.50 \pm 0.32 \text{ Nm}^{-1}$ ,  $n = 12$ ,  $P < 0.01$ , en la presencia y ausencia de fenilefrina más GTP- $\gamma$ -S, respectivamente) (Figura 24).



**Figura 23. Sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en arterias permeabilizadas con  $\alpha$ -toxina.** (A) Registros de fuerza que muestran las respuestas a una estimulación única con  $10 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  libre (izquierda) y la adición acumulativa de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en ausencia (derecha) y en presencia de GTP- $\gamma$ -S (B). (C) Modulación de la respuesta contráctil al  $\text{Ca}^{2+}$  por el GTP- $\gamma$ -S. (D) Relación  $p\text{Ca}^{2+}$ -tensión en presencia de  $3 \mu\text{M}$  GTP- $\gamma$ -S en arterias precontraídas submaximalmente con  $p\text{Ca}^{2+} \leq 6.71$ . Los experimentos fueron realizados a  $22^\circ\text{C}$  y pH 7.1. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4 arterias.



**Figura 24. Efecto de la inhibición de la PKC, TKs y RhoK sobre la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por fenilefrina.** (A) Registros de fuerza que muestran el efecto de los inhibidores (A) de PKC (Gö 6983) y (B) de tirosina quinasa (AG-18) sobre la respuesta contráctil proporcionada por la fenilefrina a un  $\text{pCa} \leq 6.71$  en presencia de 1  $\mu\text{M}$  GTP- $\gamma$ -S. (C) Histograma que muestra el efecto inhibitorio medio para cada uno de los inhibidores utilizados sobre la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la fenilefrina. Los experimentos fueron realizados a 22 °C y pH 7.1. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4-5 arterias.

### 1.3.2. Efecto de la inhibición de la proteína quinasa C (PKC), las tirosina quinasas (TKs) y la RhoK en la sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ inducida por activación del receptor $\alpha_1$ -adrenérgico

El siguiente grupo de experimentos se realizó con el fin de evaluar la implicación de otras quinasas en la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  bajo la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico. Los efectos de los inhibidores selectivos de la PKC,

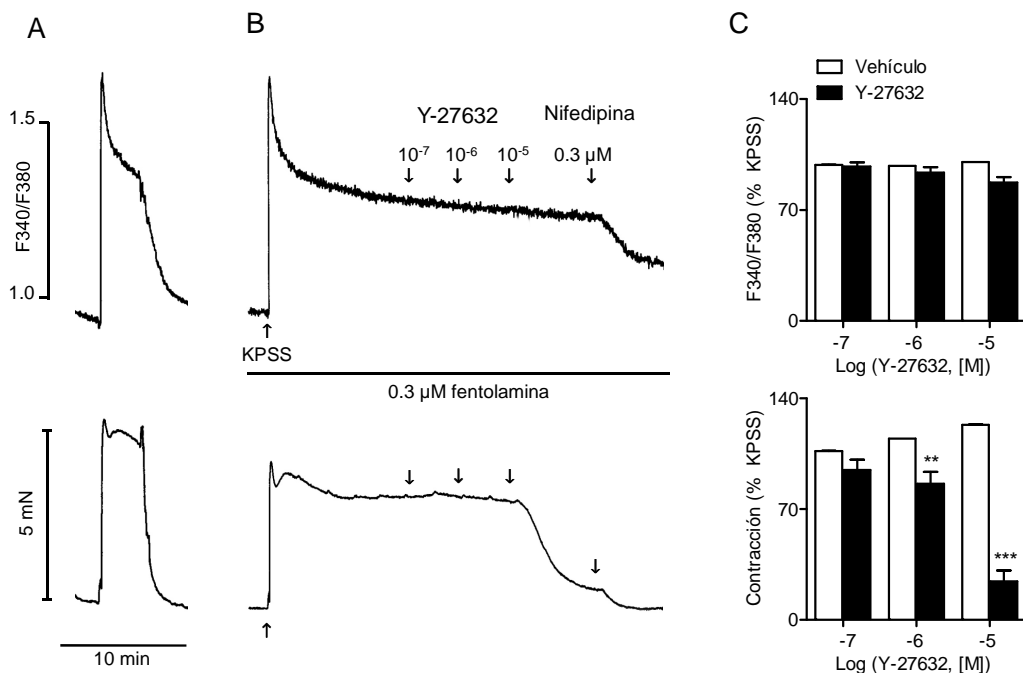


Gö6983 (3  $\mu\text{M}$ ), TK, AG-18 (100  $\mu\text{M}$ ) y RhoK, fasudil (10  $\mu\text{M}$ ) se evaluaron sobre la contracción inducida por la fenilefrina (30  $\mu\text{M}$ ) y una dosis umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de 1  $\mu\text{M}$  GTP- $\gamma$ -S. Bajo estas condiciones, los inhibidores de PKC, TK y RhoK redujeron en un  $43 \pm 8 \%$  ( $n = 5$ ),  $67 \pm 6$  ( $n = 4$ ) y un  $82 \pm 5 \%$  ( $n = 4$ ), respectivamente, el incremento de la sensibilización del aparato contráctil inducida por la fenilefrina (Figura 24).

#### 1.4. Papel de la RhoK en los mecanismos de sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$

##### 1.4.1. Efecto de la inhibición de RhoK sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la tensión inducidos por la despolarización con KPSS

En presencia de fentolamina (0.3  $\mu\text{M}$ ) para evitar los efectos de la liberación de noradrenalina de los nervios adrenérgicos, el KPSS provocó un incremento rápido y fásico en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la tensión que fue seguido de una fase sostenida (Figura 25A y B). La adición de Y-27632 (0.1 – 10  $\mu\text{M}$ ) sobre las arterias estimuladas con KPSS una vez alcanzada la fase *plateau* provocó una reducción de la contracción dependiente de la concentración siendo esta inhibición a la mayor dosis empleada (10  $\mu\text{M}$ ) de un  $80 \pm 7 \%$  del KPSS ( $n = 5$ ), con un valor de  $\text{pCl}_{50}$  de  $5.71 \pm 0.41$ . Sin embargo, la relajación producida por Y-27632 no estuvo asociada con una reducción significativa de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figura 25B y C), aunque la nifedipina (0.3  $\mu\text{M}$ ) inhibió en un  $74 \pm 4 \%$  ( $n = 5$ ) el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la tensión hasta alcanzar el nivel basal (Figura 25B). Estos datos sugieren que la despolarización por KPSS induce sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  por activación de RhoK en el tejido arterial peneano.

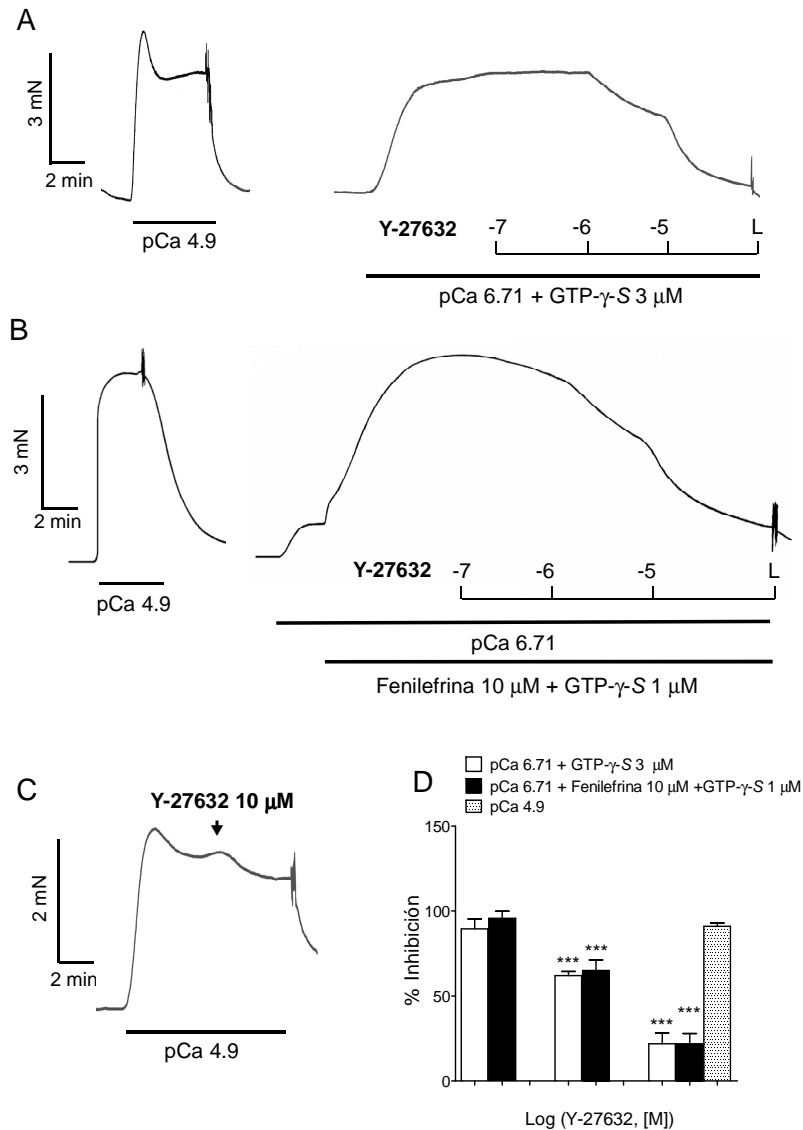


**Figura 25. El inhibidor de RhoK Y-27632 reduce la tensión pero no la  $[Ca^{2+}]_i$  en arterias despolarizadas con KPSS.** Registro que muestra los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (arriba) y la respuesta contráctil (abajo) inducidos por (A) una solución despolarizante (K<sup>+</sup> 125 mM, KPSS) y (B) el inhibidor de RhoK Y-27632. (C) Valores medios que muestran los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (arriba) y en la tensión (abajo) en respuesta a Y-27632. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5 arterias. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , significativamente diferente de la contracción inducida por KPSS en ausencia del inhibidor (vehículo).

#### 1.4.2. Efecto de la inhibición de RhoK en arterias permeabilizadas con $\alpha$ -toxina

La participación de RhoK en la sensibilización al  $Ca^{2+}$  de la maquinaria contráctil se estudió posteriormente en arterias peneanas permeabilizadas con  $\alpha$ -toxina. La inhibición de RhoK redujo la sensibilización al  $Ca^{2+}$  tanto por la activación no selectiva de los receptores acoplados a proteínas G como por la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico con fenilefrina (Figura 26). Así, el Y-27632 inhibió de manera dependiente de la concentración la potenciación inducida tanto por el análogo no hidrolizable del GTP, GTP- $\gamma$ -S (3  $\mu$ M) (Figura 26A y D) como por la fenilefrina (10  $\mu$ M) en presencia de GTP- $\gamma$ -S (1  $\mu$ M) (Figura 26B y D) sobre las contracciones inducidas por concentraciones umbrales de  $Ca^{2+}$  ( $pCa \leq 6.71$ ). Estas contracciones representaron un  $137 \pm 18$  % ( $n = 4$ ) y un  $96 \pm 7$  % ( $n = 5$ ) de la respuesta máxima inducida por una concentración máxima de  $Ca^{2+}$  libre ( $pCa 4.9$ ), respectivamente. Los valores de  $pCl_{50}$  y el efecto máximo para la inhibición del Y-27632 en arterias estimuladas por un lado en presencia de GTP- $\gamma$ -S y por otro en presencia de fenilefrina más GTP- $\gamma$ -S fueron de  $6.00 \pm 0.14$  % ( $n = 4$ ) y  $72 \pm 6$  % ( $n = 7$ ), respectivamente.

Sin embargo, el inhibidor Y-27632 (10  $\mu\text{M}$ ) tan solo inhibió en un  $9 \pm 2\%$  ( $n = 6$ ) las contracciones inducidas por una concentración maximal de  $\text{Ca}^{2+}$  (pCa 4.9) (Figura 26C y D).



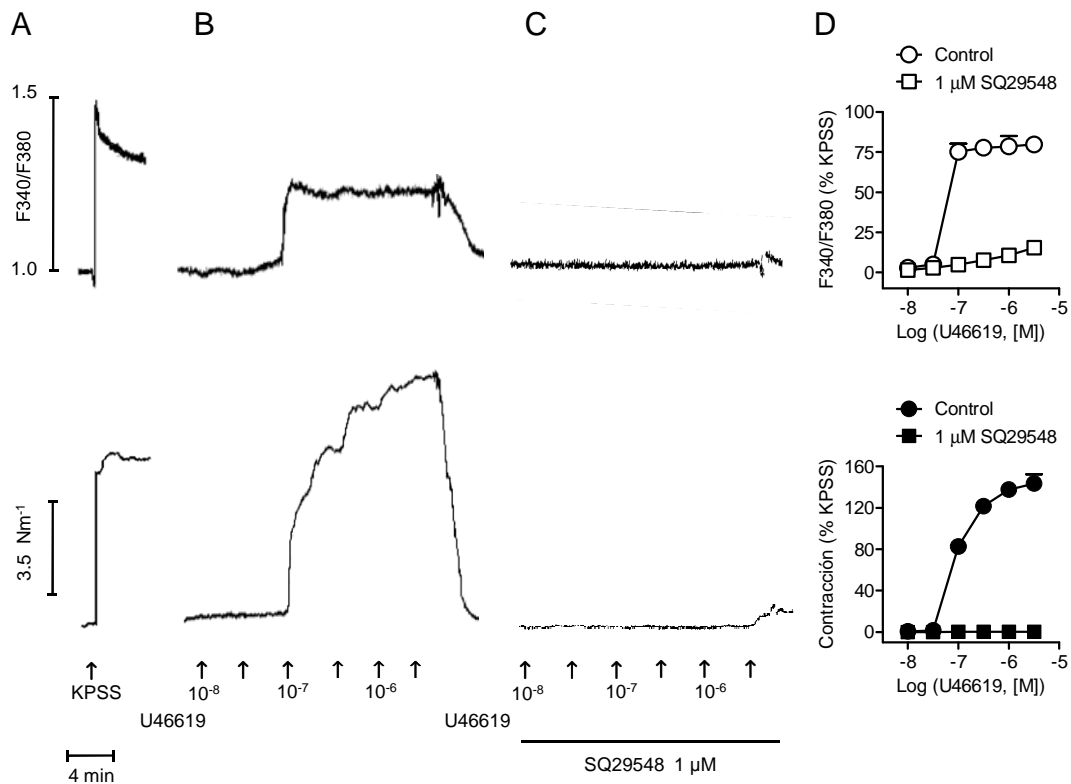
**Figura 26. Y-27632 inhibe la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en arterias permeabilizadas con  $\alpha$ -toxina.** (A y B) Registro representativo que muestra la respuesta contráctil máxima inducida por una estimulación con 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  libre (izquierda) y la adición acumulativa de Y-27632 (derecha) en arterias precontraídas con una dosis umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  (pCa  $\leq 6.71$ ) (A) en presencia de 3  $\mu\text{M}$  GTP- $\gamma$ -S y (B) en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de fenilefrina y 1  $\mu\text{M}$  de GTP- $\gamma$ -S. (C) Efecto del inhibidor Y-27632 (10  $\mu\text{M}$ ) sobre la contracción inducida por una concentración maximal de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (pCa = 4.9). (D) Histograma que muestra el efecto inhibitorio medio del Y-27632. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4-7 arterias. \*\*\* $P < 0.001$ .

## **2. MECANISMOS DE ENTRADA DE $\text{Ca}^{2+}$ Y DE SENSIBILIZACIÓN AL $\text{Ca}^{2+}$ ACOPLADOS A LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR TP EN ARTERIAS PENEANAS**

### **2.1. Caracterización de los mecanismos de entrada de $\text{Ca}^{2+}$ desde el medio extracelular**

#### **2.1.1. Efecto de la activación del receptor TP sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la tensión**

Con objeto de investigar la participación del receptor del tromboxano  $\text{A}_2$  (TP) en la vasoconstricción peneana se realizaron medidas simultáneas de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y de la tensión en arterias peneanas. La respuesta contráctil máxima inducida por una estimulación única con U46619 ( $0.1 \mu\text{M}$ ) fue mayor que la obtenida tras la estimulación con KPSS (Figura 27A y B). La estimulación con KPSS provocó un incremento inmediato tanto de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como de la tensión de  $0.24 \pm 0.01$  y  $1.76 \pm 1.24 \text{ Nm}^{-1}$  ( $n = 4$ ), respectivamente. El análogo del  $\text{TXA}_2$ , el U46619 produjo un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y en la tensión de manera dependiente de la concentración siendo la contracción máxima un  $80 \pm 4 \%$  y  $143 \pm 7 \%$  del KPSS ( $n = 5$ ), respectivamente (Figura 27B). Con objeto de estudiar la contribución de los receptores TP, las arterias se incubaron en presencia de un antagonista de los receptores TP SQ29548 ( $1 \mu\text{M}$ ) (Figura 27C) y como muestra la Figura 27D, el SQ29548 abolió tanto la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como la tensión inducidos por U46619. El tratamiento con SQ29548 no afectó a la viabilidad arterial, pues la estimulación con KPSS produjo una respuesta contráctil aún en presencia de dicho antagonista.



**Figura 27. La contracción inducida por el análogo del  $TXA_2$  U46619 está mediada por el receptor TP.** (A) Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (arriba) y en la tensión (abajo) inducidos por una solución despolarizante rica en  $K^+$  ( $K^+$  125 mM, KPSS). Curva concentración respuesta para el U46619 en ausencia (B) y en presencia (C) del antagonista selectivo del receptor TP SQ29548. (D) Resumen de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (arriba) y en la tensión (abajo) en respuesta a la adición acumulativa de U46619. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5 arterias.

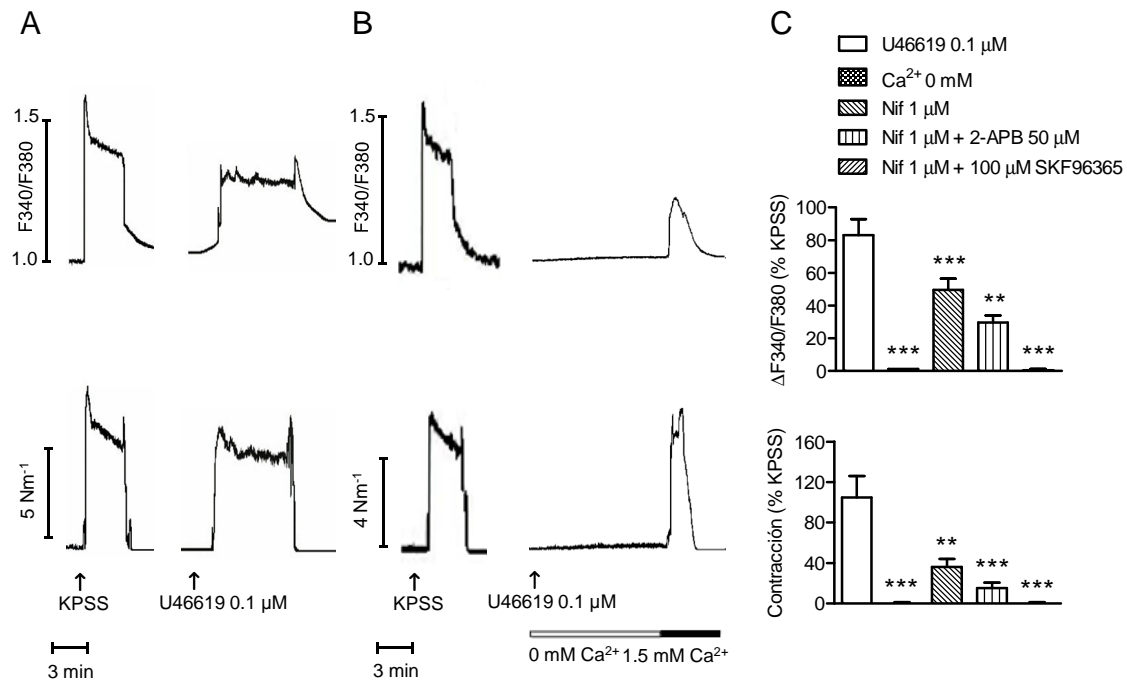
### 2.1.2. Papel del $Ca^{2+}$ extracelular en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la contracción inducidos por U46619

En presencia de PSS 1.5 mM  $Ca^{2+}$ , el agonista U46619 (0.1  $\mu M$ ) provocó un incremento sostenido tanto de la  $[Ca^{2+}]_i$  como de la tensión alcanzando en la fase *plateau* un  $83 \pm 10 \%$  y  $105 \pm 21 \%$  del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la tensión inducidos por KPSS ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ), respectivamente (Figura 28A). El efecto del U46619 en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular se investigó mediante el reemplazo de la solución del baño por PSS nominalmente libre de  $Ca^{2+}$ . Bajo estas condiciones, el U46619 no produjo ningún incremento ni de la  $[Ca^{2+}]_i$  ni de la tensión (Figura 28B). La respuesta contráctil fue un  $1.00 \pm 0.01 \%$  y  $0.12 \pm 1.00 \%$  de las inducidas por KPSS ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ), respectivamente. Esta ausencia de respuesta contráctil no fue debida a la falta de viabilidad de la

preparación, porque la readición de  $\text{Ca}^{2+}$  al baño (1.5 mM) restauró la misma (Figura 28B).

Los efectos de la inhibición de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico sobre las contracciones inducidas por el U46619 se evaluaron con ácido ciclopiazónico. El ácido ciclopiazónico no alteró ni la respuesta contráctil fásica (correspondiente al incremento en la tensión 5 minutos después de la adición del U46619) ni la tónica (medida 10 minutos después de la administración de U46619 al baño) inducidas por el U46619. La tensión media desarrollada por el U46619 para la respuesta fásica y tónica fue de  $113 \pm 10 \%$  y  $118 \pm 15 \%$  del KPSS ( $n = 6$ ) y de un  $118 \pm 7 \%$  y un  $130 \pm 8.6 \%$  del KPSS ( $n = 6$ ) en ausencia y en presencia del ácido ciclopiazónico, respectivamente. Estos resultados sugieren una escasa participación de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en la contracción mediada por el U46619 en las arterias peneanas.

El bloqueante de los canales dependientes de voltaje del tipo L nifedipina ( $1 \mu\text{M}$ ) provocó un descenso tanto de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como de la tensión inducidas por el U46619 ( $0.1 \mu\text{M}$ ), siendo un  $50 \pm 7 \%$  y un  $36 \pm 8 \%$  del KPSS, respectivamente ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ) (Figura 28C). En la presencia de nifedipina ( $1 \mu\text{M}$ ), el tratamiento con el bloqueante no selectivo de canales de cationes 2-APB ( $50 \mu\text{M}$ ) redujo el incremento tanto del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como de la tensión, siendo un  $30 \pm 4 \%$  y un  $15 \pm 5$  del KPSS ( $n = 5$ ,  $P < 0.001$ ), respectivamente (Figura 28C). Con objeto de evaluar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente al tratamiento con 2-APB en presencia de nifedipina, se utilizó el SKF96365 ( $100 \mu\text{M}$ ), el cual abolió la respuesta contráctil inducida por el U46619, siendo los cambios de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y de la tensión de un  $0.3 \pm 0.1 \%$  y un  $0.12 \pm 0.1 \%$  del KPSS ( $n = 3$ ), respectivamente (Figura 28C).



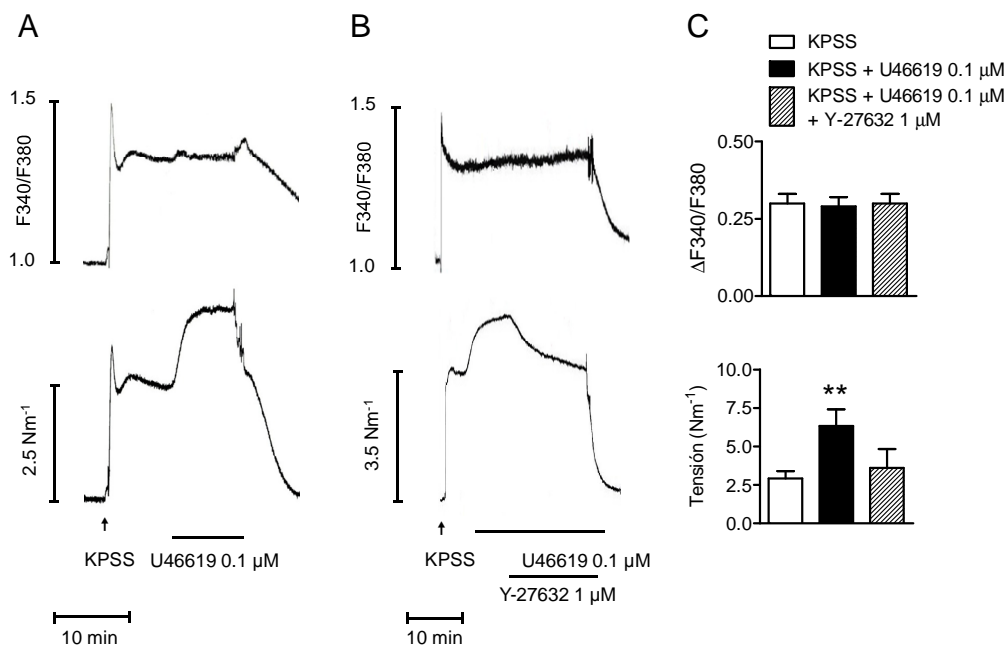
**Figura 28. La contracción inducida por el análogo del TXA<sub>2</sub> U46619 es dependiente de la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular en las arterias peneanas de la rata.** Cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (arriba) y en la tensión (abajo) inducidos por (A) una solución despolarizante (K<sup>+</sup> 125 mM, KPSS) y por una dosis submaximal de U46619 (0.1  $\mu$ M) en presencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular (1.5 mM) y (B) una dosis única submaximal de U46619 en un medio nominalmente libre de Ca<sup>2+</sup>. (C) Resumen de los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (arriba) y en la tensión (abajo) en respuesta a la adición de diferentes bloqueantes de canales de Ca<sup>2+</sup> (Nif, nifedipina) o de cationes (2-APB; SKF96365). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4 arterias. \*\*\* $P$  < 0.001; \*\* $P$  < 0.01 vs arterias estimuladas con U46619.

## 2.2. Papel de RhoK en los mecanismos de sensibilización al Ca<sup>2+</sup> activados por U46619

### 2.2.1. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la contracción inducida por U46619

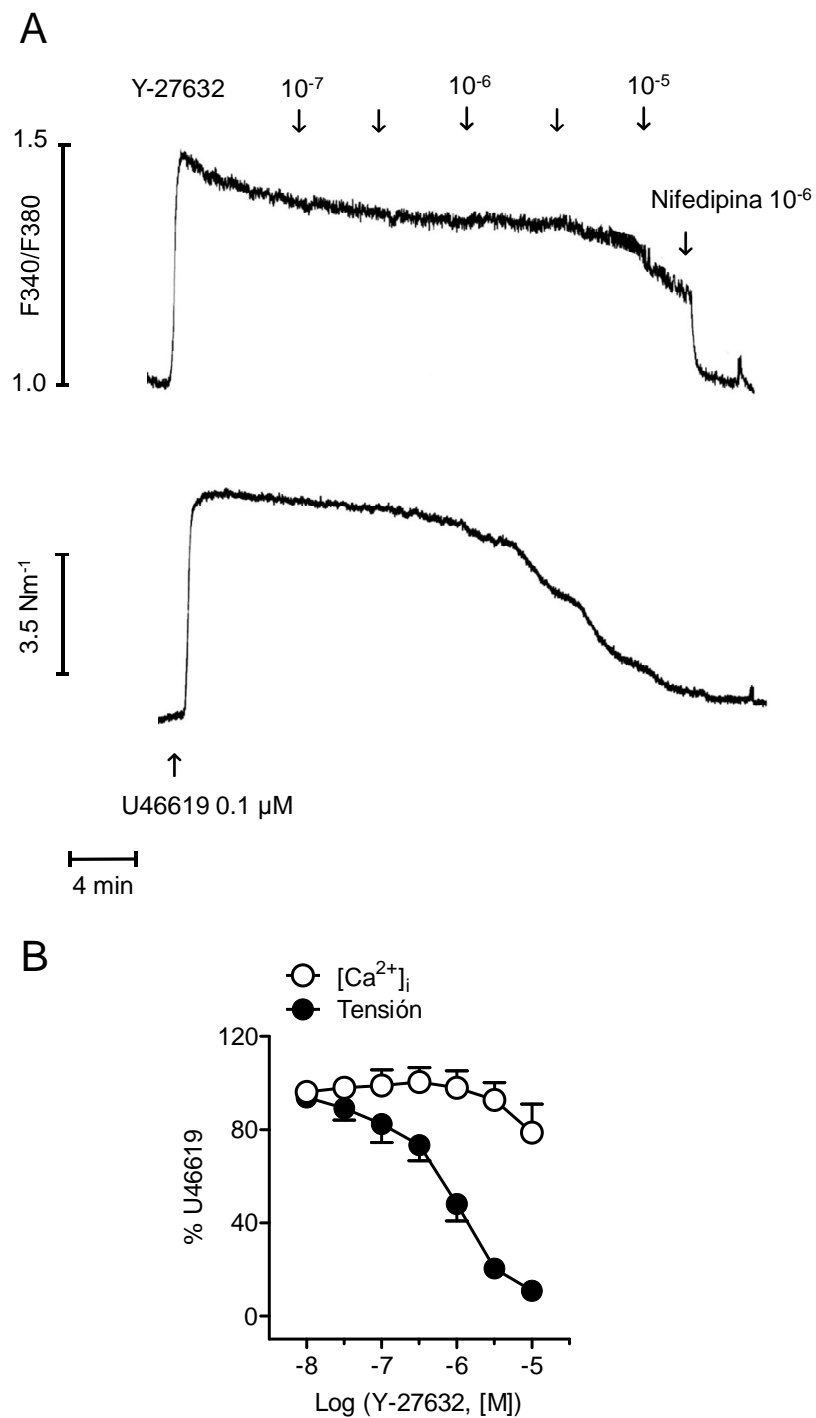
El incremento de la tensión en ausencia de cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> o sensibilización al Ca<sup>2+</sup> inducida por activación del receptor TP se evaluó en arterias peneanas mediante medidas simultáneas de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y tensión isométrica. La Figura 30 muestra la adición acumulativa del inhibidor de RhoK Y-27632 (0.1 – 1  $\mu$ M) sobre arterias precontraídas con una dosis submaximal de U46619 (0.1  $\mu$ M). El inhibidor Y-27632 produjo una relajación dependiente de la concentración sin alterar la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. El valor de pCl<sub>50</sub> para el efecto inhibitor del Y-27632 sobre la tensión fue de  $6.05 \pm 0.01$  ( $n = 4$ ).

En presencia de fentolamina (0.1  $\mu\text{M}$ ) para antagonizar la contracción mediada por el receptor  $\alpha$ -adrenérgico y en arterias contraídas con KPSS, la adición de U46619 causó un incremento en la contracción sin alterar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , mostrando la activación del mecanismo de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por RhoK. La adición de una dosis única de Y-27632 (1  $\mu\text{M}$ ) a arterias precontraídas con KPSS y U46619 (0.1  $\mu\text{M}$ ) abolió completamente el incremento en la tensión sin alterar significativamente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figura 29B y C).



**Figura 29. El análogo del  $\text{TXA}_2$  U46619 induce sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en las arterias peneanas de la rata.** (A) Cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (arriba) y en la tensión (abajo) inducidos por una solución despolarizante de  $\text{K}^+$  ( $\text{K}^+$  125 mM, KPSS) y por una dosis submaximal de U46619. (B) Efecto del inhibidor de RhoK Y-27632 sobre los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (arriba) y en la tensión (abajo) en respuesta a la estimulación con una dosis submaximal de U46619 en arterias precontraídas con KPSS. (C) Resumen de los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (arriba) y en la tensión (abajo) en respuesta a los diferentes tratamientos. Los experimentos fueron realizados en presencia de 0.1  $\mu\text{M}$  fentolamina. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 6-8 arterias.  $^{**}P < 0.01$  significativamente diferente de la contracción inducida por el KPSS.



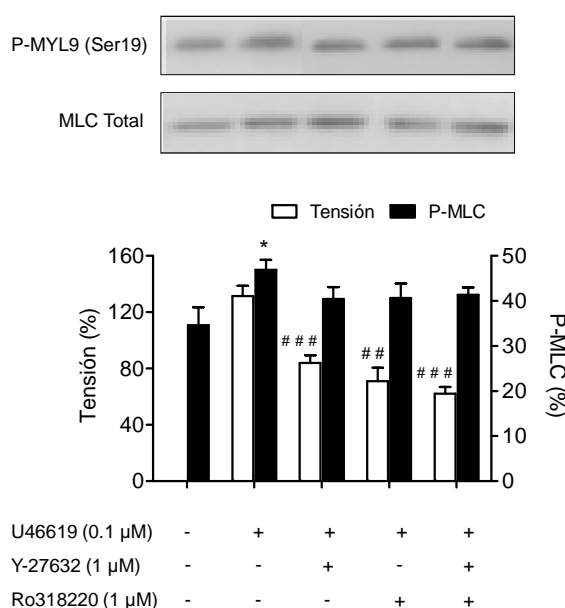


**Figura 30. Sensibilización al  $Ca^{2+}$  mediada por RhoK tras la activación del receptor TP en las arterias peneanas de la rata.** (A) Efecto del inhibidor de RhoK Y-27632 en arterias precontraídas con 0.1 μM U46619 sobre los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (arriba) y en la tensión (abajo). (B) Resumen de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión en respuesta a la adición acumulada de Y-27632. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4 arterias. La  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión están expresados como % de la precontracción.

### 2.2.2. Efecto de la inhibición de RhoK y PKC sobre la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina (MLC<sub>20</sub>) y de la subunidad reguladora de la fosfatasa (MYPT) inducida por U46619

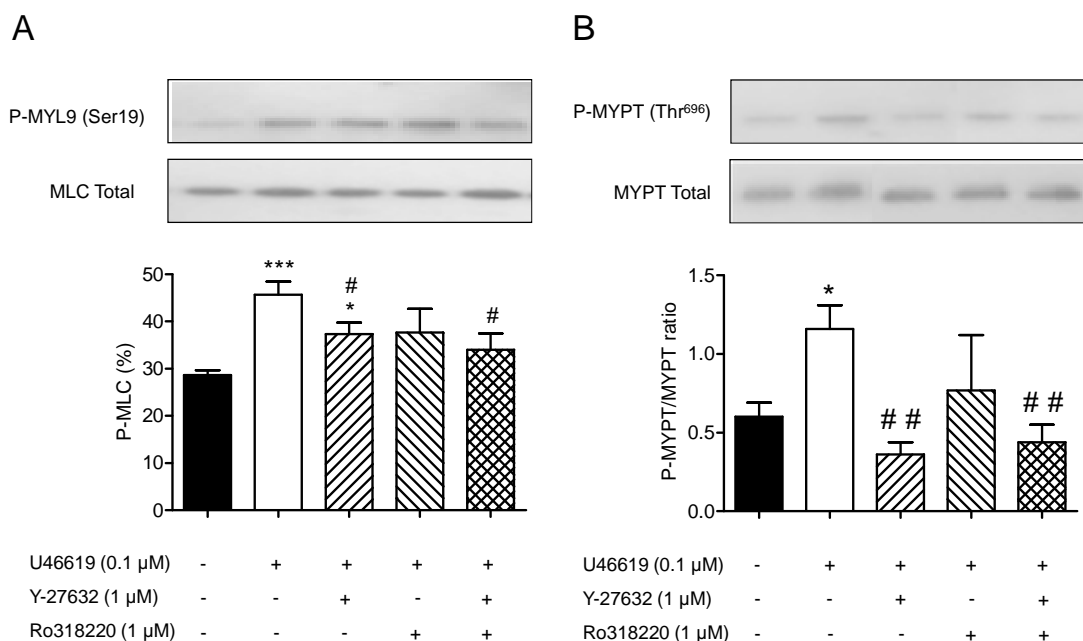
Con objeto de estudiar la participación de las quinasas Rho y PKC en la sensibilización al Ca<sup>2+</sup> se analizó mediante Western blotting la expresión de la MLC<sub>20</sub> en su estado no fosforilado y fosforilado. El nivel de fosforilación de la MLC<sub>20</sub> en arterias sin estimular fue de un  $34 \pm 4 \%$ ,  $n = 4$ . La estimulación de las arterias con  $0.1 \mu\text{M}$  U46619 durante 10 minutos provocó un incremento del nivel basal de fosforilación de un  $47 \pm 2 \%$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$  (Figura 31). Como muestra la Figura 31, el pretratamiento con el inhibidor de RhoK Y-27632 ( $1 \mu\text{M}$ ) produjo un descenso de la tensión ( $84 \pm 6 \%$  para arterias tratadas con el inhibidor vs  $131 \pm 7.3 \%$  para arterias estimuladas con U46619 en ausencia del inhibidor,  $n = 5$ ,  $P < 0.001$ ), mientras el nivel de fosforilación de la MLC<sub>20</sub> se incrementó en un  $40 \pm 3 \%$  con respecto a los niveles basales,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ . El inhibidor de la PKC Ro31-8220 ( $1 \mu\text{M}$ ) inhibió la contracción inducida por U46619 y también produjo una inhibición significativa de la fosforilación de la MLC<sub>20</sub> ( $38 \pm 2 \%$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ , después del tratamiento con Ro31-8220) con respecto a las estimuladas con U46619 en ausencia del inhibidor (Figura 31). La inhibición combinada de la PKC y RhoK atenuó la contracción mediada por U46619 y redujo el nivel de fosforilación en comparación con los valores obtenidos para la estimulación con U46619 solo ( $40 \pm 1 \%$ ,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ).

El U46619 provocó un incremento significativo de la fosforilación de la MLC<sub>20</sub> en el cuerpo cavernoso en comparación con el control ( $45 \pm 3 \%$ ,  $n = 6$  vs  $28 \pm 1 \%$ ,  $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ). La incubación con Y-27632 ( $1 \mu\text{M}$ ) durante 20 minutos inhibió el incremento en la fosforilación inducido por el U46619 comparado con los controles o con el agonista solo ( $37.3 \pm 2.4 \%$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). Sin embargo, el inhibidor de PKC Ro31-8220 ( $1 \mu\text{M}$ ) no alteró significativamente la fosforilación de la MLC<sub>20</sub> ( $38 \pm 5 \%$ ,  $n = 5$ ) (Figura 32A). La inhibición combinada de la RhoK y PKC no alteró el nivel de fosforilación comparado con los cuerpos cavernosos expuestos al agonista U46619 solo. En la ausencia de U46619, la adición de Y-27632, Ro31-8220 o ambos, no resultó afectó la fosforilación de la MLC<sub>20</sub> (datos no mostrados).



**Figura 31. Efecto de los inhibidores de RhoK y PKC Y-27632 y Ro31-8220, respectivamente sobre la tensión y fosforilación de la cadena ligera de miosina en arterias peneanas.** Los blots muestran la fosforilación de la MLC<sub>20</sub> (P-MYL9) y MLC total en homogenados obtenidos a partir de arterias peneanas. El diagrama de barras representa la cuantificación de las bandas obtenidas en los experimentos de Western blot (expresadas como porcentaje de la proteína total) respecto al control. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5-6 arterias. \* $P < 0.05$  vs control; ### $P < 0.01$ . #### $P < 0.001$  vs arterias estimuladas con U46619.

Existen numerosas evidencias que sugieren que diversas quinasas son capaces de fosforilar a la proteína MYPT en el residuo Thr<sup>696</sup>. MYPT se expresa en arterias peneanas (datos no mostrados), pero debido al pequeño tamaño arterial y la limitada cantidad de muestra que se obtiene de las arterias peneanas dorsales de la rata, dichos experimentos fueron realizados en cuerpo cavernoso. En el cuerpo cavernoso, U46619 indujo un incremento de la fosforilación de MYPT-Thr<sup>696</sup> (Figura 32B) que fue inhibido tanto por el inhibidor de la PKC Ro31-8220 (1 μM) como por el inhibidor de RhoK Y-27632, comparado con arterias control y arterias estimuladas con el agonista ( $0.3 \pm 0.08$  %,  $n = 4$ ,  $P < 0.01$  vs agonista solo). La inhibición combinada de la PKC y RhoK no provocó un efecto aditivo en la inhibición de la fosforilación. Estos resultados sugieren que la fosforilación de MYPT en el residuo Thr<sup>696</sup> está regulada por la vía de RhoA/RhoK en el cuerpo cavernoso.



**Figura 32. Efecto de los inhibidores de RhoK y PKC Y-27632 y Ro31-8220, respectivamente, sobre la fosforilación de la MLC (P-MYL9) y de la subunidad reguladora de la fosfatasa MYPT en el cuerpo cavernoso.** Los blots muestran (A) la fosforilación de la MLC (P-MYL9) y MLC Total y (B) la fosforilación de MYPT (P-MYPT) y MYPT Total. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 3-6 arterias. \* $P < 0.05$  y \*\*\* $P < 0.001$  vs control; ## $P < 0.01$  y #### $P < 0.001$  vs arterias estimuladas con U46619.

### 3. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA VASCULOPATÍA DIABÉTICA

Como se ha indicado en el apartado de Material y Métodos, la caracterización inicial de la estructura y de las propiedades funcionales de las arterias peneanas en la rata OZR, se llevó a cabo de forma comparada con las arterias coronarias.

#### 3.1. Parámetros metabólicos y hemodinámicos de las ratas Zucker

A la edad de 17-18 semanas tanto el peso corporal de las ratas OZR como sus niveles de colesterol total y triglicéridos fueron significativamente mayores comparados con los animales control. En las ratas obesas los niveles de insulina plasmática alcanzaron niveles tres veces superiores a los encontrados en las ratas control y la glucemia también resultó superior en estos animales comparada con la de las ratas LZR (Tabla 4). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los valores de presión arterial sistémica o número de latidos por minuto entre ambos grupos de animales. El

peso del corazón fue similar en las ratas OZR y LZR, mientras que el peso del pene fue menor en las ratas OZR comparado con las LZR (datos no mostrados).

**Tabla 4:** Parámetros hemodinámicos y metabólicos de las ratas Zucker.

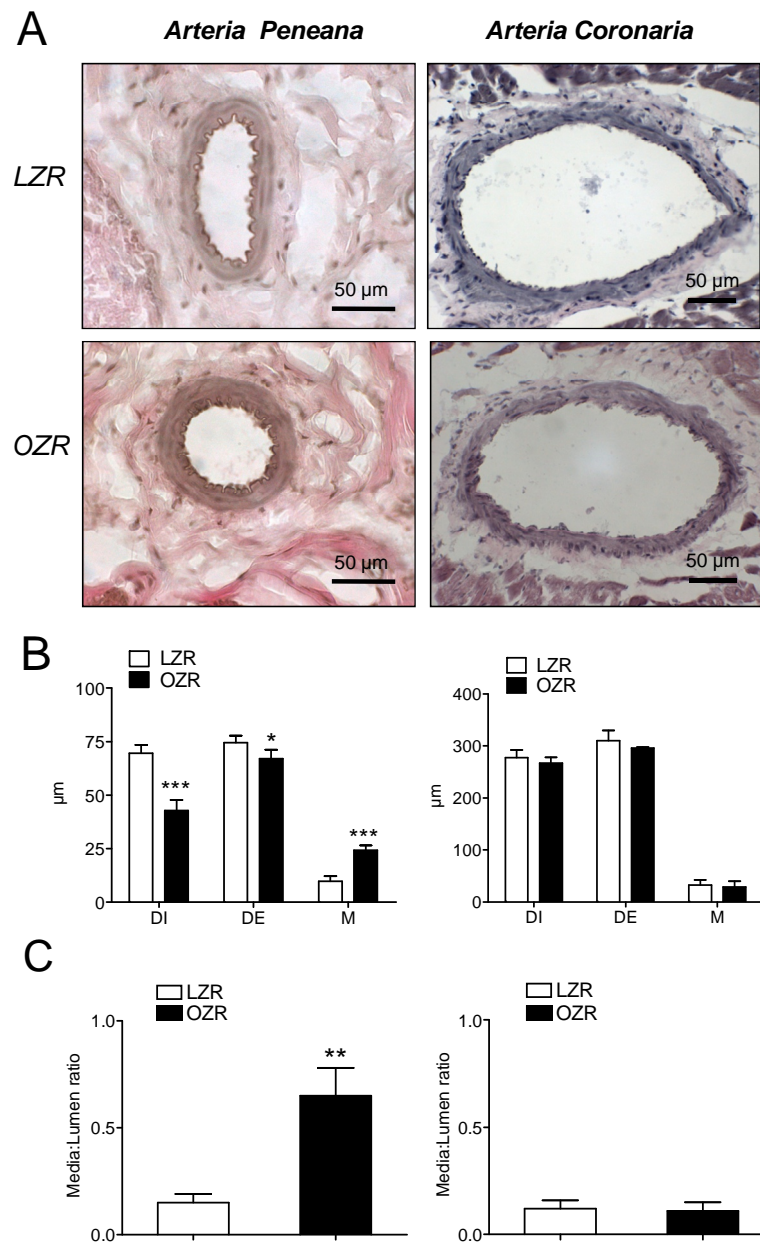
	<i>LZR</i>	<i>n</i>	<i>OZR</i>	<i>n</i>
Peso corporal (g)	368 ± 9	22	483 ± 8 <sup>***</sup>	22
Peso corazón (g)	1.95 ± 0.12	8	1.91 ± 0.10	8
Peso VI (g)	1.36 ± 0.08	8	1.34 ± 0.07	8
PAS (mm Hg)	122 ± 1.9	6	128.5 ± 4.5	6
Nº latidos/min	344 ± 8	6	340.5 ± 7.3	6
Ratio VI	0.37 ± 0.02	8	0.28 ± 0.01 <sup>**</sup>	8
[Glucosa] <sub>sangre</sub> (mg/dl)	105.5 ± 8.2	15	180.8 ± 21.5 <sup>*</sup>	16
[Insulina] <sub>plasma</sub> (ng/ml)	1.27 ± 0.17	10	3.78 ± 0.34 <sup>***</sup>	10
[Colesterol total] <sub>plasma</sub> (mg/dl)	92.1 ± 3.5	15	188.0 ± 10.9 <sup>***</sup>	16
[Triglicéridos] <sub>plasma</sub> (mg/dl)	84.5 ± 5.8	15	322.1 ± 27.8 <sup>***</sup>	16
Edad (nº semanas)	17-18		17-18	

Los valores representan la media ± error estándar; Ratas Zucker lean o controles (LZR) y ratas Zucker obesas (OZR); *n* = número de animales; Ventrículo izquierdo (VI); Ratio VI fue calculado como los g de VI/100 g peso corporal total. Las diferencias fueron analizadas por *t* Test no pareado. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.001, \*\*\**P* < 0.0001 vs LZR.

### 3.2. Estructura y análisis morfométrico de las preparaciones arteriales

El análisis morfométrico demostró que tanto el diámetro externo como el diámetro interno de las arterias peneanas se encuentran reducidos en las ratas OZR mientras que la relación media-lumen se encuentra incrementada aproximadamente hasta cuatro veces en dichos animales (Figura 33B y C). Sin embargo, no se observaron cambios ni en el diámetro externo ni en el interno, ni en el grosor de la capa media ni en la relación media-lumen de las arterias coronarias de las ratas OZR (Figura 33B y C). De acuerdo con los datos del análisis morfométrico, los diámetros internos normalizados (*l<sub>i</sub>*) fueron significativamente menores en las arterias peneanas de las ratas OZR comparadas con las ratas control (132 ± 4 y 160 ± 6 μm, *n* = 32, *P* < 0.001, en ratas OZR y LZR, respectivamente), mientras que los valores correspondientes

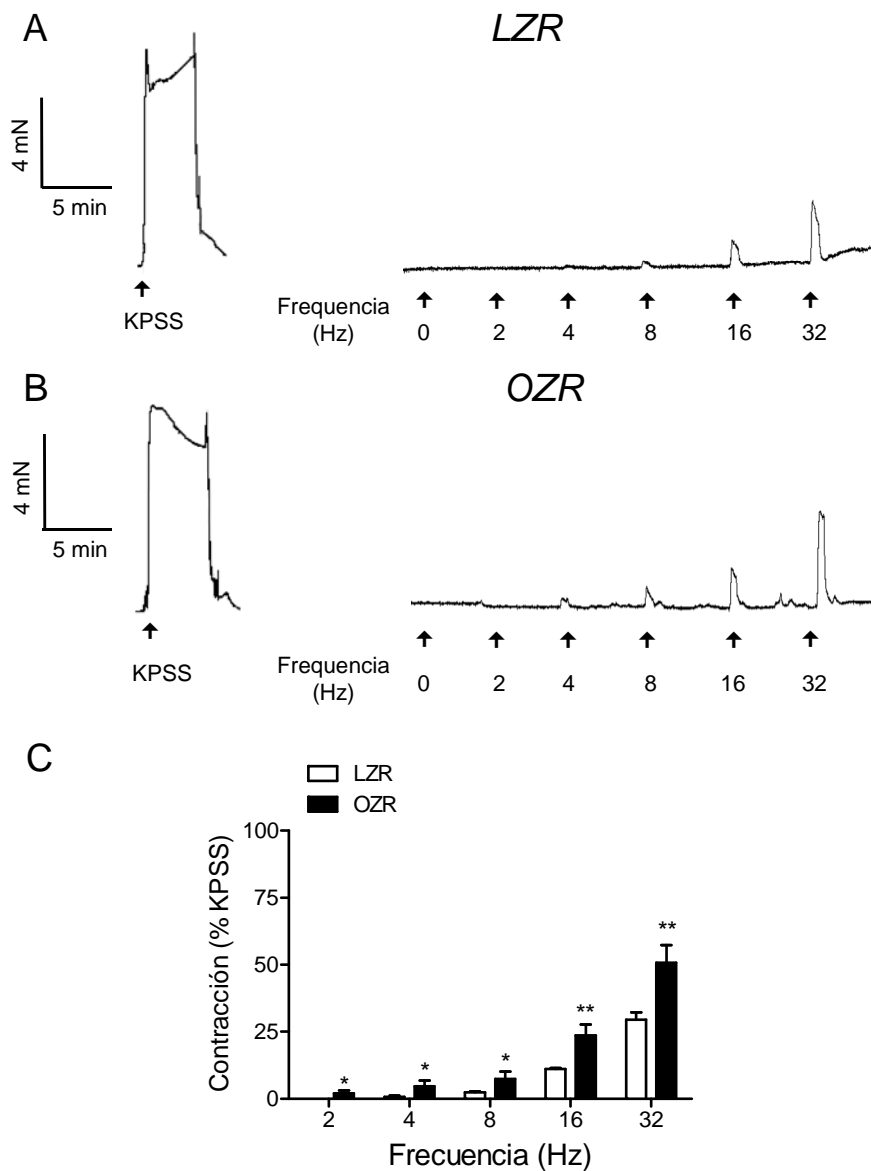
a  $l_1$  fueron similares en arterias coronarias en ambos grupos de animales ( $289 \pm 10$  y  $273 \pm 11 \mu\text{m}$ ,  $n = 26$ , respectivamente).



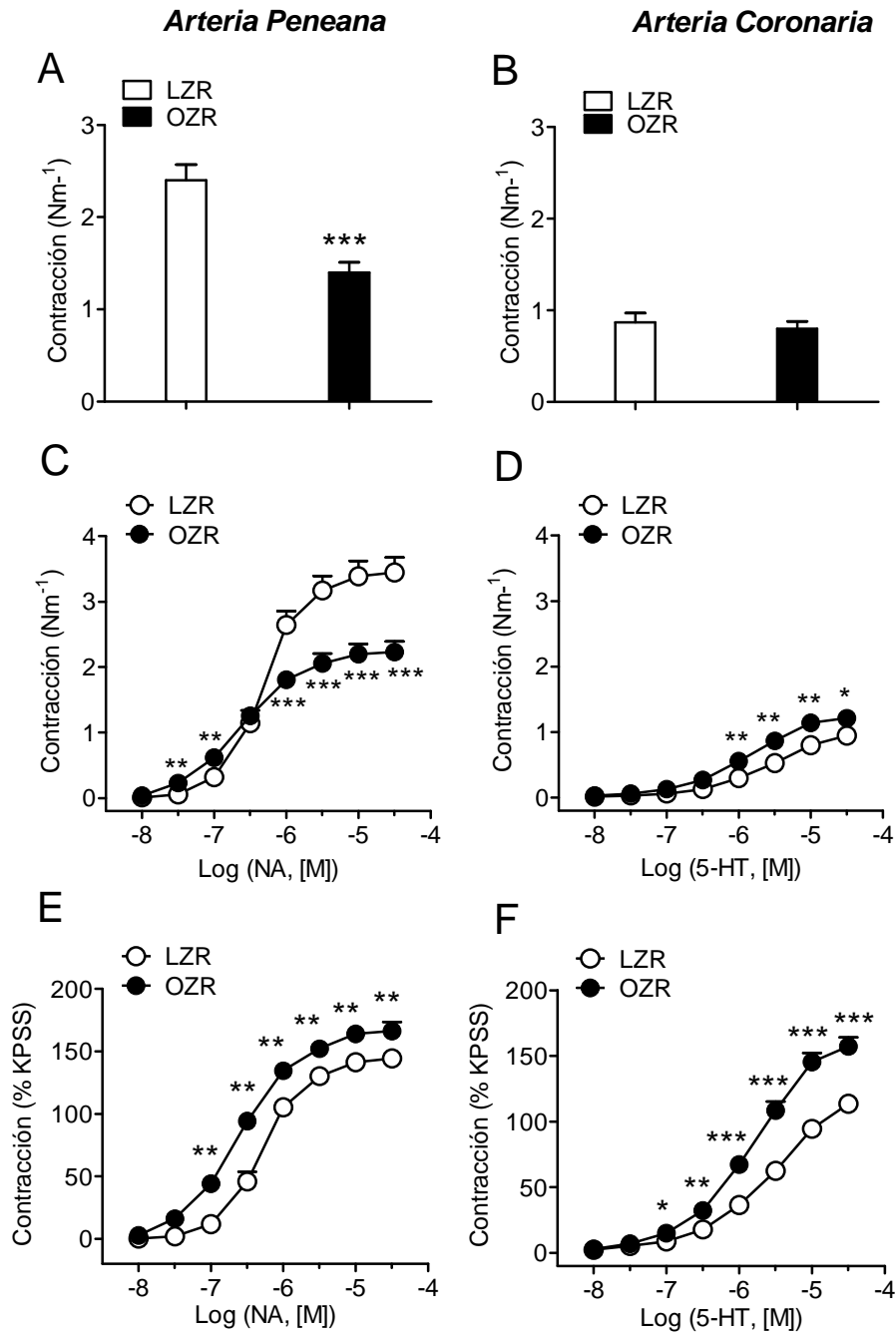
**Figura 33. La relación media-lumen se encuentra incrementada cuatro veces en las arterias peneanas de ratas Zucker obesas (OZR) mientras la estructura se encuentra preservada en las arterias coronarias.** (A) Tinción de hematoxilina-eosina de secciones de arterias peneanas (izquierda) y coronarias (derecha) de ratas Zucker lean (LZR) y OZR. (B y C) Histogramas que muestra el análisis morfométrico [diámetros del vaso (B) y relación media-lumen (C)]. Diámetro interno (DI); Diámetro externo (DE); Grosor de la capa media (M). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 8 arterias peneanas y 4 arterias coronarias. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$  vs LZR.

### 3.3. Estudio de la vasoconstricción inducida por EET, KPSS y agonistas

La EET se llevó a cabo sobre el tono basal en arterias peneanas de ratas LZR y OZR dando lugar a contracciones dependientes de la frecuencia (0-32 Hz), siendo la máxima respuesta a 32 Hz y alcanzando valores de  $29.5 \pm 2.6$  ( $n = 7$ ) y  $50.8 \pm 6.5$  % del KPSS ( $n = 7$ ,  $P < 0.01$ ), respectivamente (Figura 34).



**Figura 34. La vasoconstricción inducida por la estimulación eléctrica transmural (ETT) está incrementada en los animales OZR.** Registro de tensión isométrica que muestra la respuesta contráctil inducida por la despolarización con KPSS (*izquierda*) y la EET (*derecha*) en animales (A) LZR y (B) OZR sobre la tensión basal. (C) Valores medios obtenidos sobre las contracciones inducidas por la EET. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 7 arterias. \* $P < 0.1$ , \*\* $P < 0.01$ , significativamente diferente de la contracción inducida por la EET en animales LZR.



**Figura 35. La vasoconstricción inducida por agonistas está aumentada tanto en las arterias peneanas como en las coronarias de las ratas OZR.** Valores medios obtenidos sobre las contracciones inducidas por (A y B) el KPSS y por agonistas (C-F). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 7-9 arterias. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.001$  significativamente diferente de la contracción en animales LZR.

La estimulación de las arterias con KPSS provocó contracciones que fueron significativamente menores en las arterias peneanas de ratas OZR que en las LZR (correspondientes a  $21.1 \pm 1.7$  vs  $30.8 \pm 1.3$  kPa ( $n = 26$ ,  $P < 0.001$ ), respectivamente (Figura 35A). Sin embargo, las contracciones

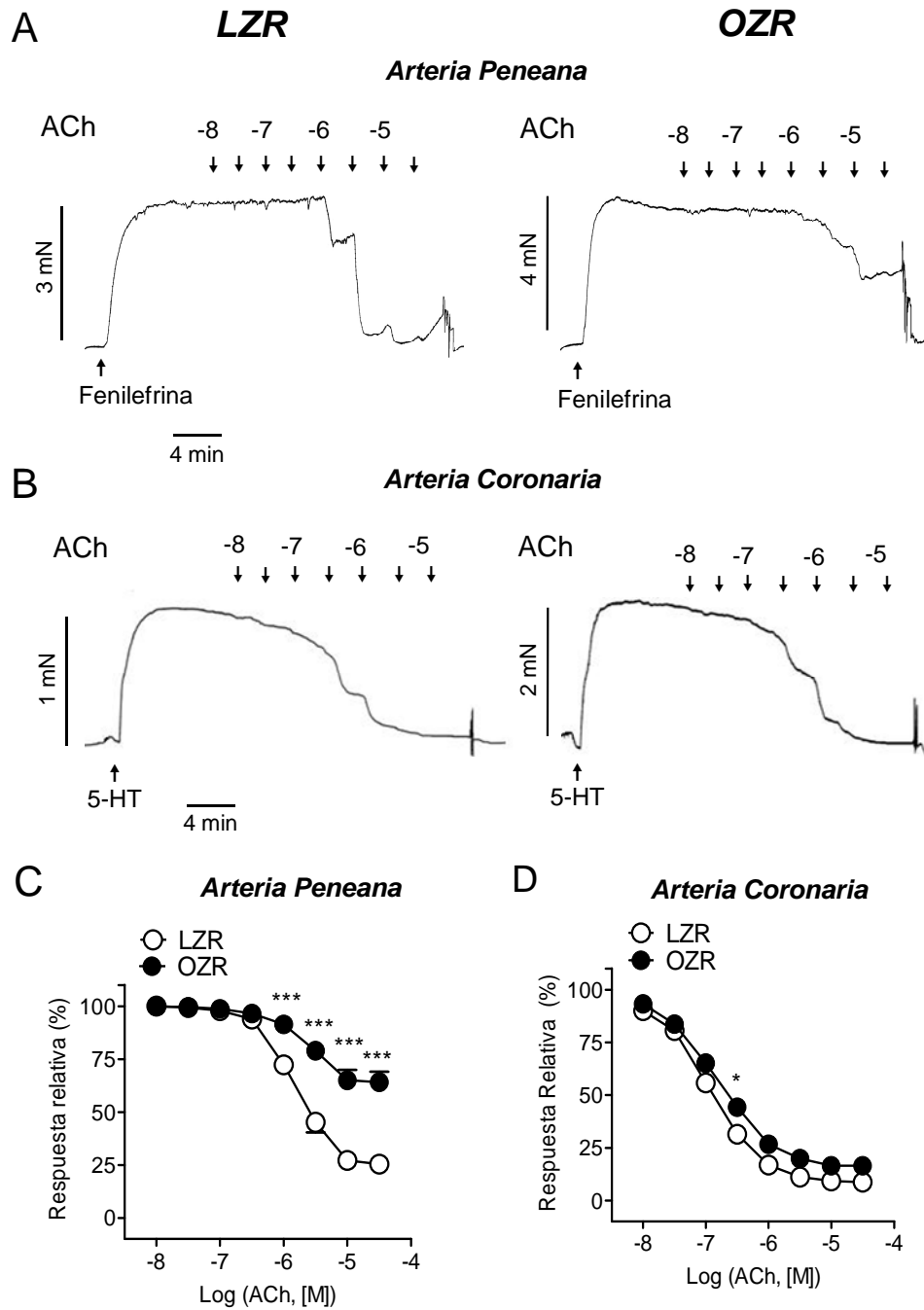


inducidas por el KPSS fueron similares en las arterias coronarias de animales LZR y OZR ( $6.0 \pm 0.7$  kPa,  $n = 28$ , y  $5.6 \pm 0.5$  kPa,  $n = 26$ , respectivamente; Figura 35B). La comparación de la respuesta contráctil inducida por agonistas reveló que la vasoconstricción se encuentra incrementada tanto en arterias peneanas como en coronarias de ratas OZR comparadas con las ratas LZR (Figura 35C-F). Aunque la contracción máxima proporcionada por el agonista noradrenalina fue significativamente menor en arterias peneanas de las ratas OZR comparadas con las procedentes de animales LZR ( $33.7 \pm 2.3$  vs  $44.5 \pm 1.8$  kPa,  $n = 26$ ,  $P < 0.001$ ; Figura 35C), la sensibilidad al agonista adrenérgico se encontró incrementada significativamente en arterias peneanas de ratas OZR (con valores de  $pD_2$  de  $6.51 \pm 0.06$  vs  $6.71 \pm 0.09$  para LZR y OZR, respectivamente,  $n = 27$ ,  $P < 0.05$ ). Las respuestas vasoconstrictoras a la serotonina fueron mayores en arterias coronarias de ratas OZR comparadas con las LZR, tanto en términos de contracción máxima ( $8.4 \pm 0.8$  vs  $6.6 \pm 0.7$  kPa,  $P < 0.05$ ,  $n = 26$ ; Figura 35, D y F) como de sensibilidad (con valores de  $pD_2$  de  $6.14 \pm 0.07$  vs  $5.66 \pm 0.11$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 26$ ; respectivamente).

### 3.4. Estudio de la vasodilatación dependiente del endotelio

Con objeto de estudiar la vasodilatación dependiente del endotelio, se realizaron CCR de acetilcolina en arterias precontraídas con fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ) en el caso de las arterias peneanas o serotonina ( $20 \mu\text{M}$ ) para las arterias coronarias. La acetilcolina produjo relajaciones dependientes de la concentración que estuvieron alteradas en las arterias peneanas de ratas OZR comparadas con ratas LZR (valores de  $pD_2$  de  $5.79 \pm 0.06$  vs  $5.51 \pm 0.09$ ,  $n = 23$ ,  $P < 0.01$ , en LZR y OZR, respectivamente (Figura 36A y C). La relajación inducida por la acetilcolina fue similar en arterias coronarias de ratas LZR y OZR obteniéndose valores de  $pD_2$  de  $6.9 \pm 0.06$  y de  $6.74 \pm 0.07$  ( $n = 27$ ) en LZR y OZR, respectivamente (Figura 36B y D). A diferencia de la acetilcolina, las relajaciones inducidas por el donante de NO SNAP fueron comparables tanto en arterias peneanas como coronarias en ambos grupos de animales. Así, los valores de  $pD_2$  que se obtuvieron para arterias peneanas fueron de  $6.36 \pm 0.17$  y  $6.39 \pm 0.04$  y como respuesta máxima  $94 \pm 2 \%$  y  $93 \pm 2 \%$  ( $n = 9$ ) en animales LZR y OZR, respectivamente. En el caso de las arterias coronarias

se obtuvieron valores de  $pD_2$  de  $6.22 \pm 0.14$  y  $6.37 \pm 0.23$  y respuestas máximas de  $94 \pm 5 \%$  y  $88 \pm 3 \%$  ( $n = 8$ ) en ratas LZR y OZR, respectivamente.



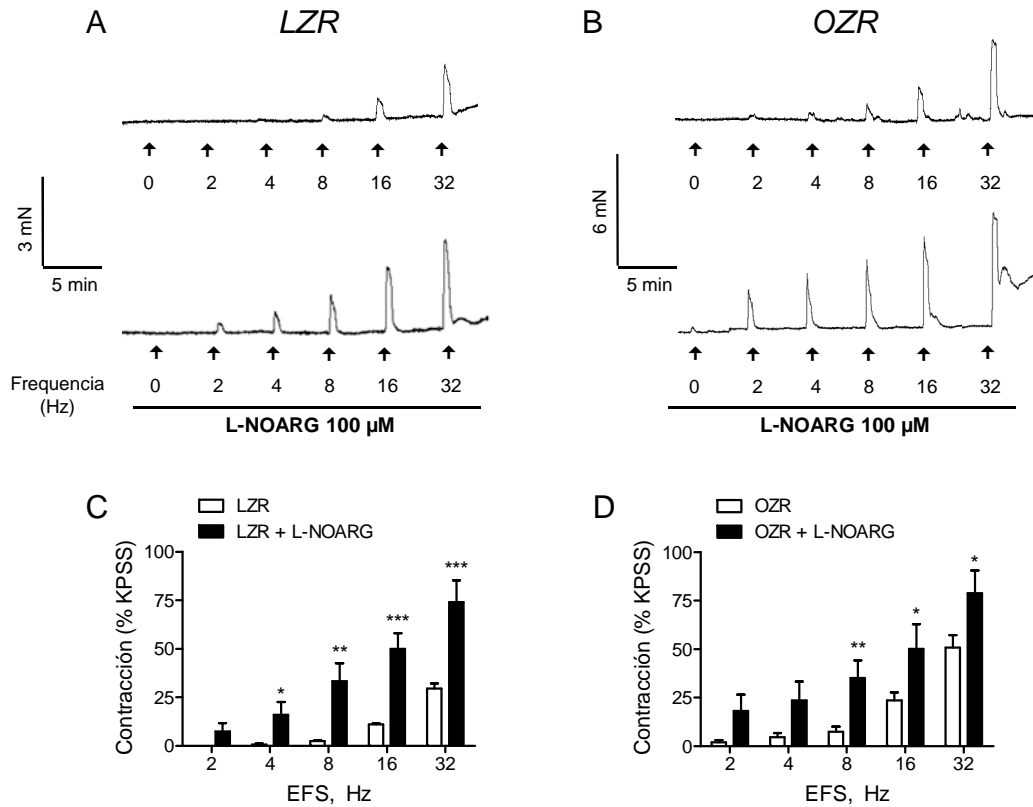
**Figura 36. La relajación dependiente del endotelio está alterada en las arterias peneanas pero no en las coronarias de las ratas OZR.** Registros de tensión isométrica que muestra la relajación inducida por la acetilcolina (ACh) en arterias peneanas (A) y en coronarias (B) de ratas LZR y OZR. (C y D) Relajación media inducida por la ACh en arterias peneanas (C) y en coronarias (D).  $n = 23-27$  arterias. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 7-9 arterias. \* $P < 0.1$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs LZR.

### 3.5. Implicación del NO en la reactividad vascular alterada

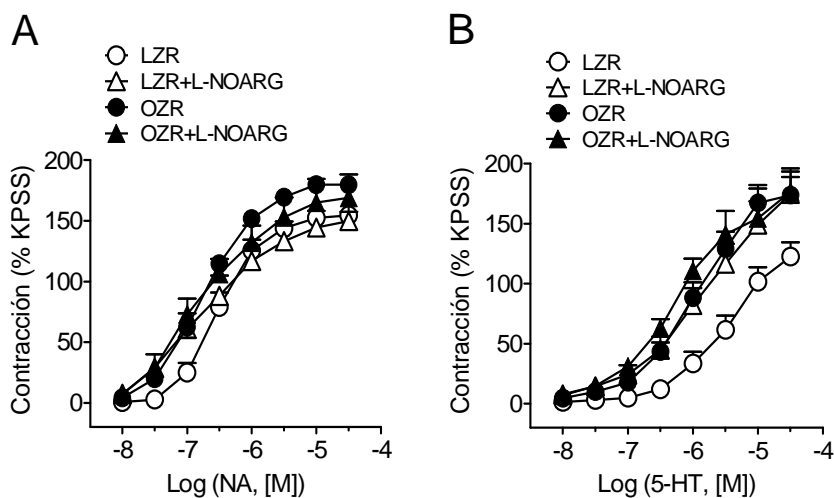
#### 3.5.1. Papel del NO en la vasoconstricción inducida por EET y agonistas

Con el fin de investigar si alteraciones en la producción endógena de NO pueden tener un papel importante en las respuestas dependientes del endotelio que se encuentran alteradas en las arterias peneanas, y en la vasoconstricción aumentada observada en ambos lechos vasculares en las ratas OZR, las respuestas a la EET y a los agonistas vasoconstrictores, noradrenalina y serotonina se evaluaron bajo condiciones de bloqueo de la NOS con L-NOARG (100  $\mu$ M) en arterias de ratas LZR y OZR. La Figura 37 muestra el efecto del tratamiento con L-NOARG sobre las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica de los nervios (0-32 Hz) en arterias peneanas, que incrementó de manera significativa estas respuestas en ambos grupos de animales. Sin embargo, en presencia de L-NOARG, las contracciones inducidas por la EET no fueron diferentes en arterias de animales LZR y OZR, alcanzando valores la respuesta contráctil a 32 Hz del  $74 \pm 11\%$  ( $n=7$ ) y del  $79 \pm 12\%$  ( $n = 7$ ) del KPSS en LZR y OZR, respectivamente.

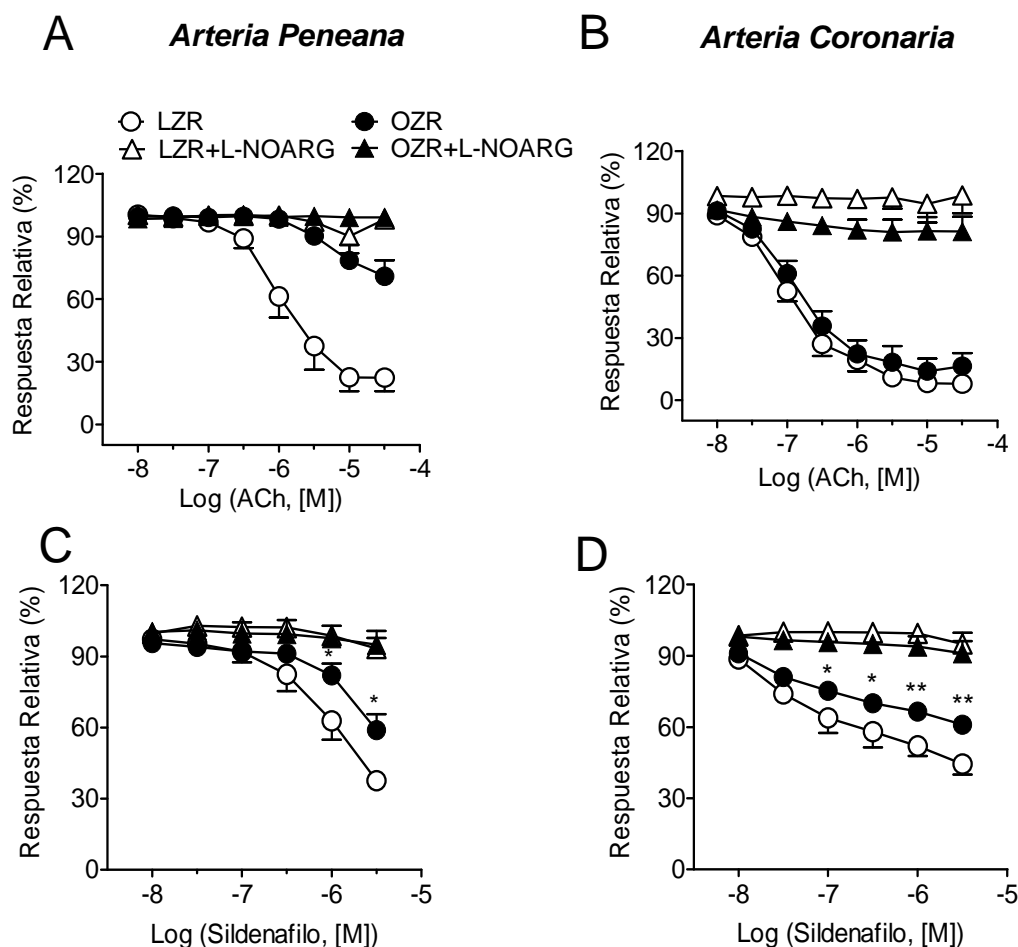
La Figura 38 muestra el efecto de la inhibición de la síntesis de NO en la respuesta vasoconstrictora a la noradrenalina en arterias peneanas y a la serotonina en arterias coronarias, efecto especialmente marcado en estas últimas. A diferencia de las LZR, el bloqueo de la NOS no incrementó significativamente la respuesta contráctil a la noradrenalina (Figura 38A y Tabla 5) ni a la serotonina (Figura 38B y Tabla 5) en arterias de ratas OZR. Estos resultados demuestran que existe una producción endógena de NO que compensa la vasoconstricción en arterias LZR, y que se encuentra alterada en los animales OZR.



**Figura 37.** La inhibición de la síntesis de NO aumenta las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica transmural (EET) en las arterias peneanas e iguala las respuestas contráctiles en animales LZR y OZR. Registro que muestra la respuesta contráctil inducida por la EET en arterias peneanas de (A) animales LZR y (B) animales OZR en condiciones control (*arriba*) y en presencia de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG) (*abajo*). Valores medios del efecto de la L-NOARG sobre las contracciones inducidas por la EET en animales LZR (C) y en OZR (D). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5-7 arterias. \* $P < 0.1$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , significativamente diferente de la contracción control en ausencia del inhibidor.



**Figura 38.** Efecto del bloqueo de la sintasa del NO en la vasoconstricción inducida por agonistas. Valores medios obtenidos sobre las contracciones inducidas por (A) la noradrenalina (NA) en arterias peneanas y (B) la serotonina (5-HT) en arterias coronarias en animales LZR y OZR en condiciones basales y en presencia de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG) (100  $\mu$ M). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 7-9 arterias.



**Figura 39. La inhibición de la sintasa del NO (NOS) bloqueó la vasodilatación inducida por la acetilcolina (ACh) y por el sildenafil.** Efecto del bloqueo de la sintasa del NO con N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG) (100  $\mu$ M) sobre las relajaciones inducidas por la ACh (A y B) y por el sildenafil (C y D) en arterias peneanas y coronarias de ratas LZR y OZR. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 vs LZR.

### 3.5.2. Papel del NO en la vasodilatación inducida por agonistas y por la inhibición de la fosfodiesterasa 5 (PDE-5)

La alteración de las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio se estudió mediante el empleo del agonista colinérgico acetilcolina y el inhibidor de la fosfodiesterasa-5 sildenafil bajo condiciones de bloqueo de la NOS con L-NOARG. Dicho tratamiento redujo la relajación inducida por la acetilcolina tanto en arterias peneanas como en arterias coronarias de ratas LZR (Figura 39 y Tabla 5), sugiriendo que dichas respuestas son el resultado de la producción endógena de NO. El tratamiento con L-NOARG también redujo la vasorelajación inducida por la acetilcolina en las arterias peneanas (Figura 39A y Tabla 5) y en las arterias coronarias (Figura 39B y Tabla 5) de las ratas OZR. Por otro lado, el sildenafil produjo relajaciones dependientes de la

concentración en ambos lechos vasculares y en los dos grupos de animales, siendo significativamente menores en las ratas OZR comparado con sus controles LZR (Figura 39C y D). Las respuestas vasodilatadoras inducidas por el sildenafil en las arterias peneanas y coronarias fueron abolidas por el bloqueo de la NOS tanto en animales LZR como en los OZR (Figura 39C y D; Tabla 5). Estos resultados indican que el efecto relajante del sildenafil es debido a la producción basal endógena de NO, la cual se encuentra alterada en ambos lechos vasculares procedentes de ratas OZR comparado con sus controles LZR.

**Tabla 5.** Efecto del bloqueo de la sintasa del NO (NOS) sobre la respuesta vasoconstrictora a la noradrenalina (NA) y a la 5-HT, y vasodilatadora a la acetilcolina (ACh) y sildenafil en arterias peneanas y coronarias de las ratas Zucker.

	<b>LZR</b>		<b>OZR</b>		<b>n</b>
	<i>pD<sub>2</sub></i>	<i>Emáx</i> (%)	<i>pD<sub>2</sub></i>	<i>Emáx</i> (%)	
<b>Arterias Peneanas</b>					
NA	6.53 ± 0.09	154 ± 6	6.87 ± 0.12 <sup>d</sup>	180 ± 22 <sup>f</sup>	7
+ L-NOARG	7.28 ± 0.38 <sup>a</sup>	150 ± 6	6.94 ± 0.11	169 ± 19	7
ACh	5.9 ± 0.16	78 ± 7	5.13 ± 0.18 <sup>e</sup>	29 ± 8 <sup>f</sup>	7
+ L-NOARG	-----	2 ± 4 <sup>c</sup>	-----	1 ± 4 <sup>b</sup>	7
Sildenafil	6.29 ± 0.1	64 ± 4	5.75 ± 0.12 <sup>d</sup>	42 ± 6 <sup>e</sup>	7
+ L-NOARG	-----	7 ± 5 <sup>c</sup>	-----	5 ± 6 <sup>c</sup>	7
<b>Arterias Coronarias</b>					
5-HT	5.67 ± 0.15	122 ± 12	6.35 ± 0.11 <sup>e</sup>	174 ± 15 <sup>e</sup>	8
+ L-NOARG	6.31 ± 0.18 <sup>b</sup>	175 ± 19 <sup>a</sup>	6.61 ± 0.12	177 ± 19	8
ACh	6.9 ± 0.11	92 ± 2	6.71 ± 0.16	82 ± 7	8
+ L-NOARG	-----	2 ± 8 <sup>c</sup>	-----	19 ± 7 <sup>c</sup>	8
Sildenafil	7.93 ± 0.16	64 ± 4	8 ± 0.17	48 ± 2 <sup>e</sup>	8
+ L-NOARG	-----	8 ± 7 <sup>c</sup>	-----	12 ± 8 <sup>e</sup>	8

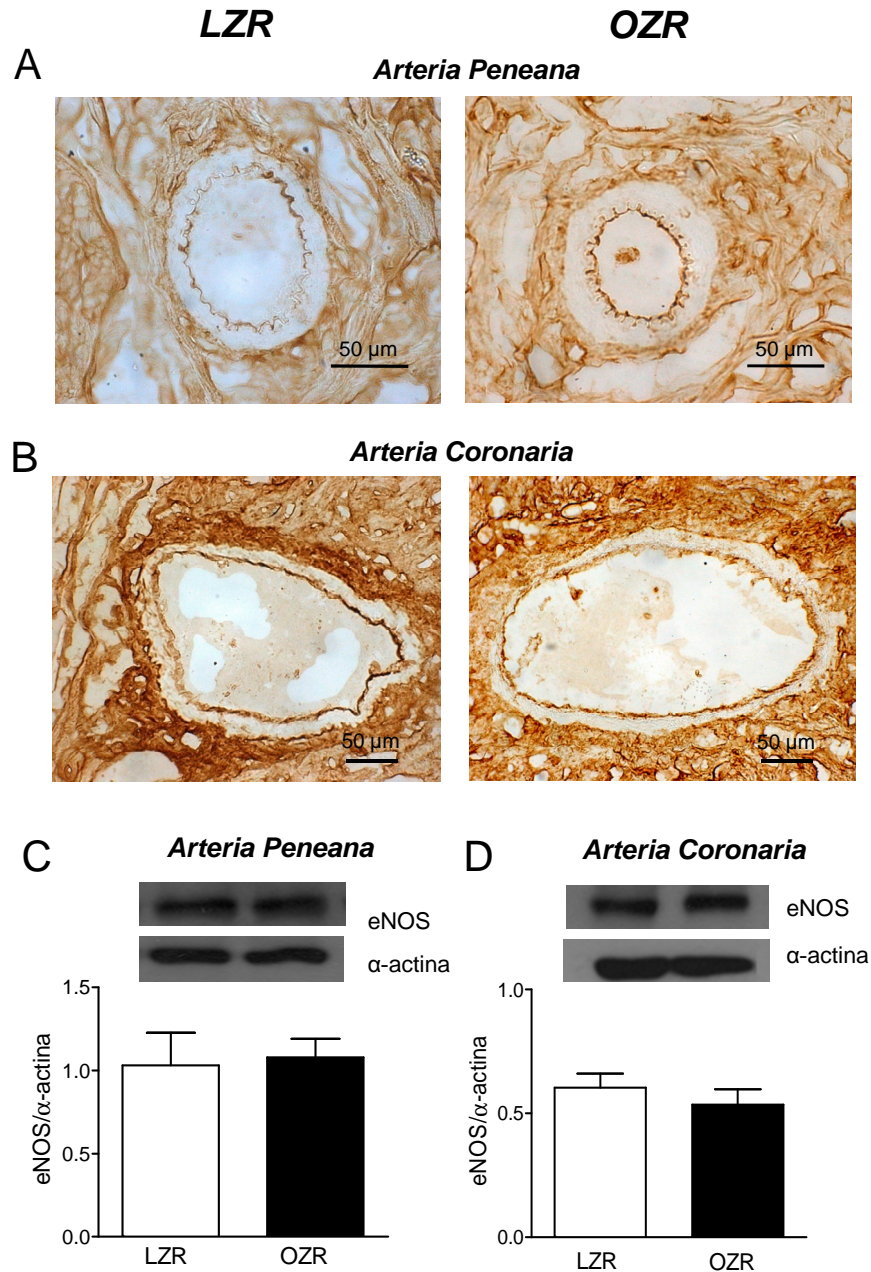
Los valores representan la media ± ESM; Ratas Zucker lean (LZR) y ratas Zucker obesas (OZR); *n* = número de animales. Las diferencias fueron analizadas por *t* Test pareado o no pareado. <sup>a</sup>*P* < 0.05; <sup>b</sup>*P* < 0.01 y <sup>c</sup>*P* < 0.001 vs LZR en ese grupo (*t* Test pareado); <sup>d</sup>*P* < 0.05; <sup>e</sup>*P* < 0.01 y <sup>f</sup>*P* < 0.001 vs LZR en ese grupo (*t* Test no pareado).

### **3.6. Determinación de la expresión de la enzima eNOS mediante inmunohistoquímica y Western blotting**

La presencia y distribución de la isoenzima eNOS constitutiva en el endotelio se determinó en secciones histológicas de arterias peneanas y coronarias de animales OZR y sus correspondientes controles LZR demostrándose que no existen diferencias en la expresión de la enzima entre los dos grupos de animales en ambos lechos vasculares de (Figura 40A y B). La cuantificación de la expresión de eNOS se determinó por Western blotting, el cual confirmó que no existe diferencia en el nivel de expresión de la proteína entre los grupos LZR y OZR (Figura 40C y D).

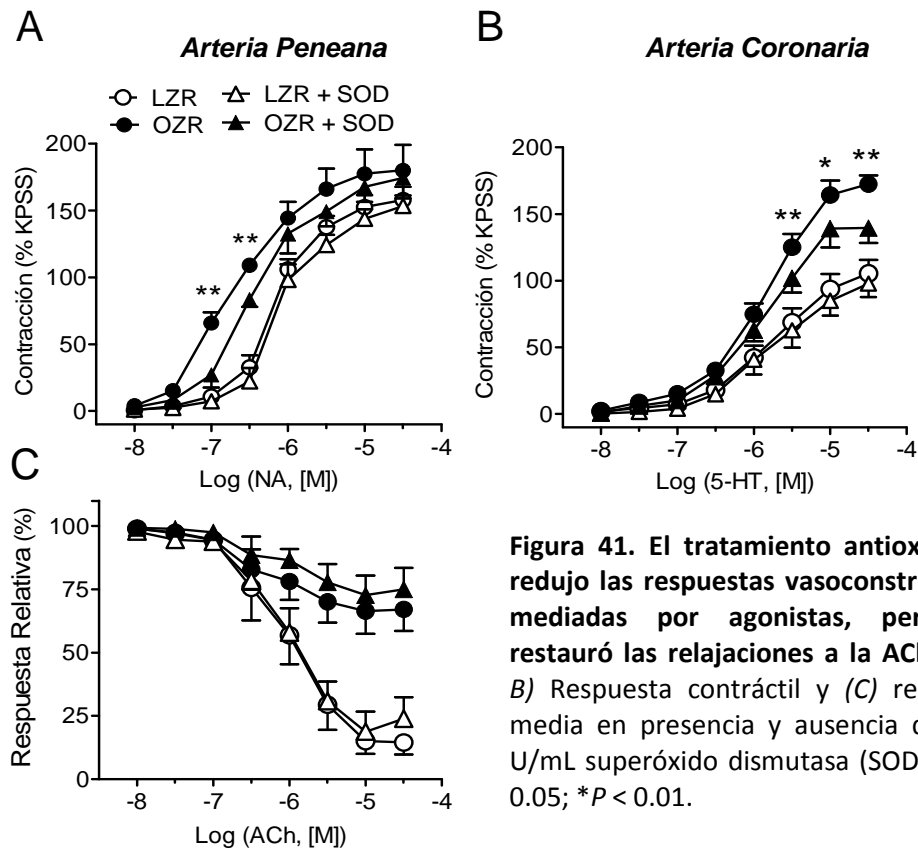
### **3.7. Papel de la producción de aniones superóxido en la reactividad vascular alterada**

La incidencia de la producción de anión superóxido tanto en las respuestas vasoconstrictoras como vasodilatadoras mediada por agonistas se estudió mediante el tratamiento agudo con SOD (150 u/mL). En estas condiciones, la vasoconstricción a la noradrenalina (arterias peneanas) y a la serotonina (arterias coronarias) que se encontraba incrementada en animales OZR se vio significativamente reducida, aunque no fue suficiente para restaurar los valores de la respuesta contráctil en el grupo de animales LZR (Figura 41A y B; Tabla 6). Por el contrario, el tratamiento antioxidante agudo no alteró las respuestas vasodilatadoras inducidas por la acetilcolina en el caso de las arterias peneanas de las ratas OZR (Figura 41C y Tabla 6).



**Figura 40. La expresión endotelial de la sintasa del óxido nítrico (eNOS) no se encuentra alterada en arterias de ratas OZR.** (A y B) Inmunohistoquímica de eNOS en secciones transversales de arteria peneana (A) y coronaria (B) de animales LZR (izquierda) y OZR (derecha). (C) Ensayos de Western blotting que muestra la expresión de eNOS; los histogramas muestran la cuantificación de las bandas obtenidas por densitometría siendo normalizadas según el contenido en  $\alpha$ -actina en arterias peneanas (C) y coronarias (D) en ambos grupos de animales ( $n = 7-10$ ).





**Figura 41.** El tratamiento antioxidante redujo las respuestas vasoconstrictoras mediadas por agonistas, pero no restauró las relajaciones a la ACh. (A y B) Respuesta contráctil y (C) relajante media en presencia y ausencia de 150 U/mL superóxido dismutasa (SOD). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

**Tabla 6.** Efecto del tratamiento agudo con SOD sobre las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras en arterias peneanas y coronarias de ratas LZR y OZR.

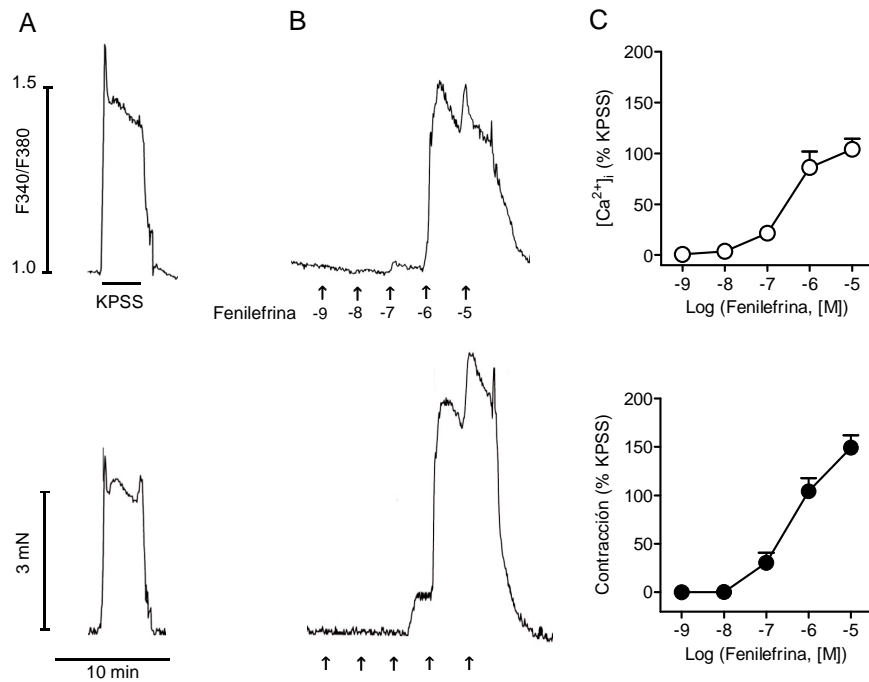
	<i>LZR</i>		<i>OZR</i>		<i>n</i>
	pD <sub>2</sub>	E <sub>máx</sub> (%)	pD <sub>2</sub>	E <sub>máx</sub> (%)	
Arterias Peneanas					
NA	6.41 ± 0.05	158 ± 10	7.10 ± 0.05 <sup>c</sup>	180 ± 20	7
+ SOD	6.35 ± 0.09	154 ± 8	6.75 ± 0.07 <sup>b,d</sup>	175 ± 16	7
ACh	5.98 ± 0.19	85 ± 5	5.80 ± 0.49	33 ± 9 <sup>e</sup>	8
+ SOD	6.02 ± 0.14	76 ± 9	5.93 ± 0.23	25 ± 9	8
Arterias Coronarias					
5-HT	5.82 ± 0.13	0.7 ± 0.09	6.14 ± 0.14	173 ± 7 <sup>c</sup>	9
+SOD	5.77 ± 0.14	0.69 ± 0.14	6.21 ± 0.16	140 ± 11 <sup>a,c</sup>	9

Los valores representan la media ± error estándar; Ratas Zucker lean (LZR) y ratas Zucker obesas (OZR);  $n$  = número de animales. Las diferencias fueron analizadas por  $t$  Test pareado o no pareado. <sup>a</sup> $P < 0.01$  y <sup>b</sup> $P < 0.001$  vs LZR en ese grupo ( $t$  Test pareado); <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; <sup>d</sup> $P < 0.01$  y <sup>e</sup> $P < 0.001$  vs LZR en ese grupo ( $t$  Test no pareado).

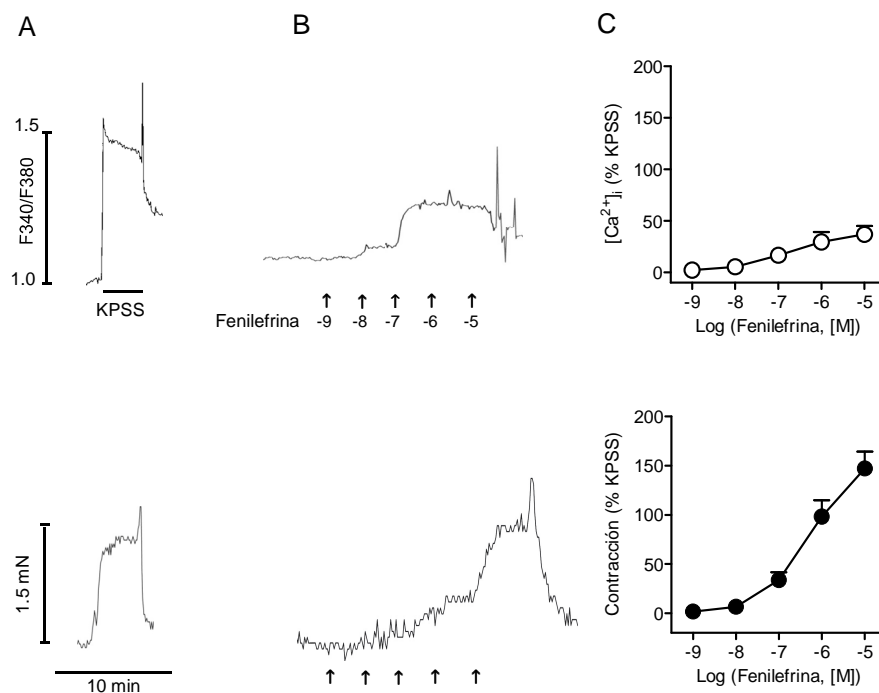
#### 4. PAPEL DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA RESPUESTA CONTRÁCTIL DE LAS ARTERIAS PENEANAS DURANTE EL SÍNDROME METABÓLICO

##### 4.1. Cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la tensión inducidos por la fenilefrina en las arterias peneanas de LZR y OZR

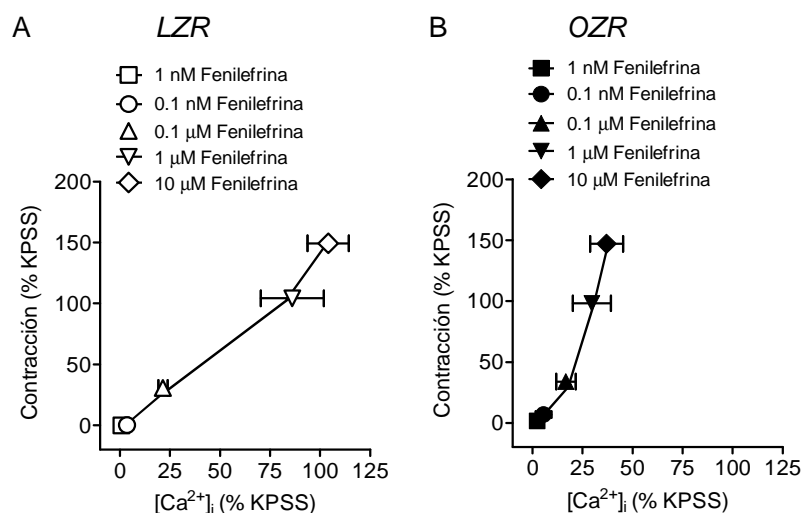
Los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y en la tensión de arterias peneanas de ratas LZR y OZR en respuesta al agonista adrenérgico fenilefrina se muestran en las Figuras 42 y 43, respectivamente. La adición acumulativa de fenilefrina provocó incrementos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  acompañados de incrementos proporcionales de la tensión en arterias de LZR (Figura 42B y C). En los animales OZR, las contracciones inducidas por la fenilefrina se relacionaron con incrementos menores en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que los observados en arterias de LZR (Figura 43B y C). Si bien no se encontraron diferencias significativas en la respuesta contráctil, los incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  estimulados por la fenilefrina fueron significativamente menores en arterias peneanas de OZR (Figura 43B y C), lo que sugiere que la vasoconstricción  $\alpha_1$ -adrenérgica es menos dependiente de la elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en los animales obesos. Esta independencia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  queda representada gráficamente en la Figura 44B. La relación que se obtuvo entre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la tensión en arterias de animales LZR fue lineal mientras en los animales OZR estuvo desplazada de forma significativa a la izquierda, lo que sugiere un descenso de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a favor de los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  estimulados por la fenilefrina en animales OZR.



**Figura 42. Vasoconstricción inducida por la fenilefrina en las ratas LZR.** Medidas simultáneas de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (arriba) y la tensión (abajo) inducidos por (A) una solución despolarizante de  $K^+$  (125 mM, KPSS) y (B) la adición acumulativa de fenilefrina. (C) Resumen de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5-9 arterias.



**Figura 43. Vasoconstricción inducida por la fenilefrina en las ratas OZR.** Medidas simultáneas de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (arriba) y la tensión (abajo) inducidos por (A) una solución despolarizante de  $K^+$  (125 mM, KPSS) y (B) la adición acumulativa de fenilefrina. (C) Resumen de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 6-7 arterias.

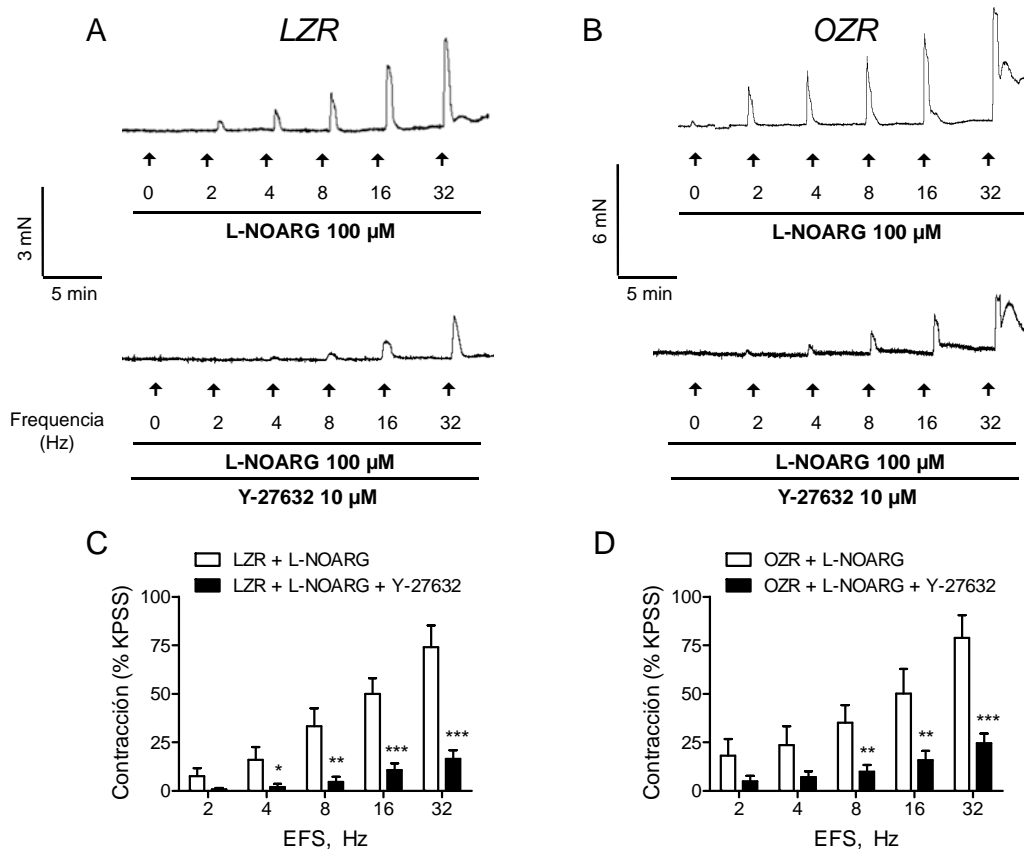


**Figura 44.** La vasoconstricción inducida por la fenilefrina es más independiente de la entrada de  $Ca^{2+}$  en las ratas OZR que en las LZR. Relaciones  $[Ca^{2+}]_i$ -tensión isométrica en respuesta a la fenilefrina en arterias peneanas (A) de animales LZR y (B) de animales OZR. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5-9 arterias para LZR y 6-7 arterias para OZR.

#### 4.2. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la EET y sobre la elevación en la $[Ca^{2+}]_i$ y la tensión inducidas por la fenilefrina

Con el fin de determinar los mecanismos implicados en el incremento de los procesos de sensibilización al  $Ca^{2+}$  en arterias peneanas de animales OZR, se evaluó el efecto de la inhibición de la enzima RhoK sobre las contracciones inducidas por la noradrenalina liberada de los nervios y por el agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina.

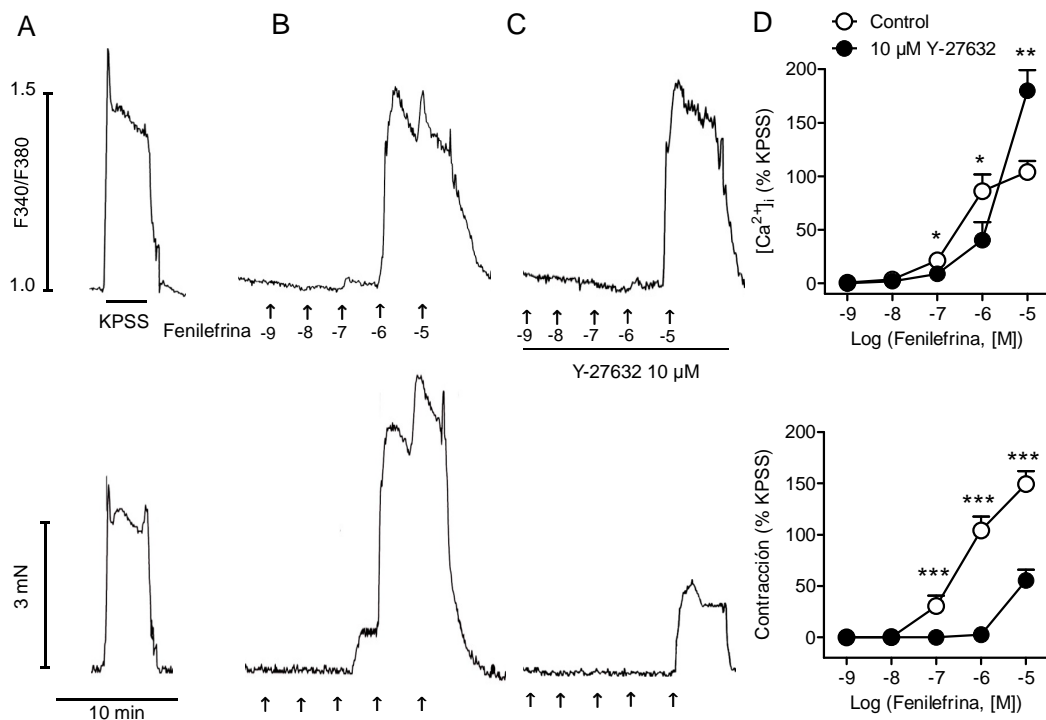
La EET se realizó en arterias peneanas de ratas OZR y sus correspondientes controles sobre el tono basal en condiciones de bloqueo de la síntesis de NO con L-NOARG (100  $\mu$ M). La EET (0-32 Hz) dio lugar a contracciones dependientes de la frecuencia en ambos grupos de animales sin encontrarse diferencias entre ambos (Figura 45). El pretratamiento con el inhibidor de RhoK Y-27632 (10  $\mu$ M) redujo significativamente las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica de los nervios tanto en arterias de animales LZR como en los OZR, obteniéndose los valores de respuesta máxima a 32 Hz y alcanzándose valores para LZR de  $1.07 \pm 0.3$  y  $0.2 \pm 0.05$   $Nm^{-1}$  ( $P < 0.001$ ,  $n = 7$ ) en ausencia y en presencia del inhibidor, respectivamente y para OZR de  $0.9 \pm 0.15$  y  $0.3 \pm 0.07$   $Nm^{-1}$  ( $P < 0.001$ ,  $n = 7$ ) en ausencia y en presencia del inhibidor, respectivamente.



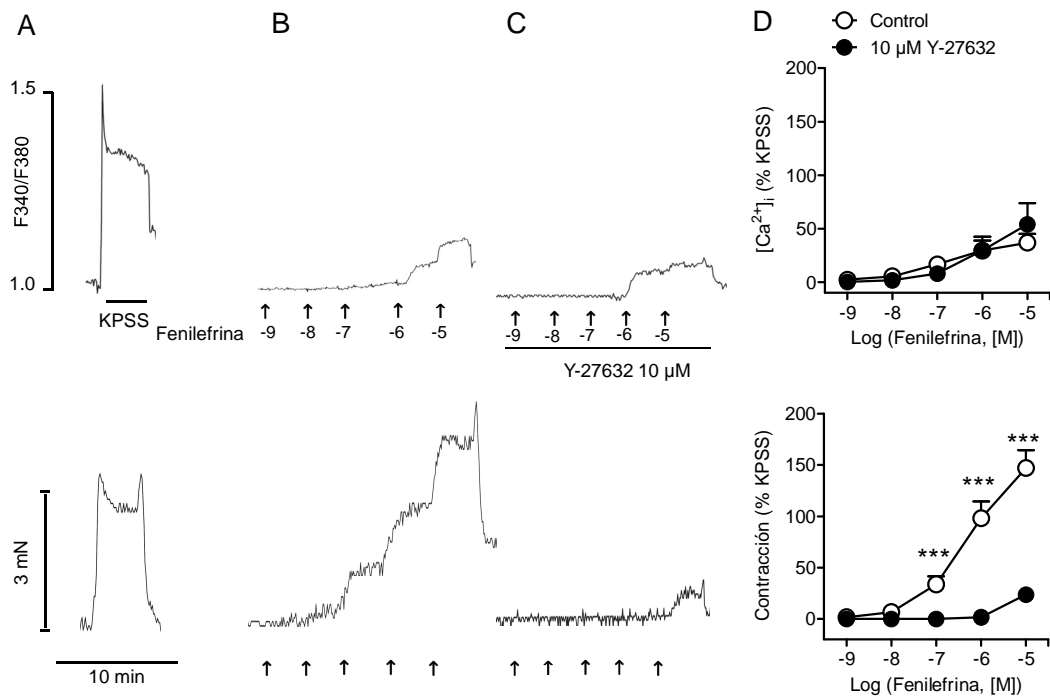
**Figura 45. El inhibidor de RhoK Y-27632 reduce las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica transmural (EET) en las arterias peneanas de animales LZR y OZR.** Registro que muestra la respuesta contráctil inducida por la EET en presencia de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100 μM) en animales control LZR (A) y en OZR (B) en ausencia de inhibidor (*arriba*) y presencia del inhibidor Y-27632 (10 μM) (*abajo*). Valores medios del efecto de Y-27632 sobre las contracciones inducidas por la EET en animales LZR (C) y en OZR (D). Los valores representan la media ± error estándar de 7 arterias. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, significativamente diferente de la contracción control inducida por la EET en ausencia del inhibidor.

Bajo condiciones control, la fenilefrina provocó vasoconstricción dependiente de la concentración de magnitud y potencia similares en arterias procedentes de animales LZR y OZR. El pretratamiento con el inhibidor de RhoK Y-27632 (10 μM) redujo significativamente y de manera dependiente de la concentración el incremento en la tensión tanto en animales LZR (Figura 46B y C) como en OZR (Figura 47B y C), siendo la respuesta máxima en presencia del inhibidor un  $55 \pm 10$  % ( $n = 6$ ) y un  $24 \pm 7$  % del KPSS ( $n = 9$ ), respectivamente y en ausencia un  $149 \pm 13$  % ( $n = 5$ ) y un  $147 \pm 17$  % del KPSS ( $n = 6$ ), respectivamente. En lo referente al efecto de la inhibición de la RhoK en los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a la fenilefrina, en los animales LZR el pretratamiento con Y-27632 tuvo un efecto dual: provocó una inhibición

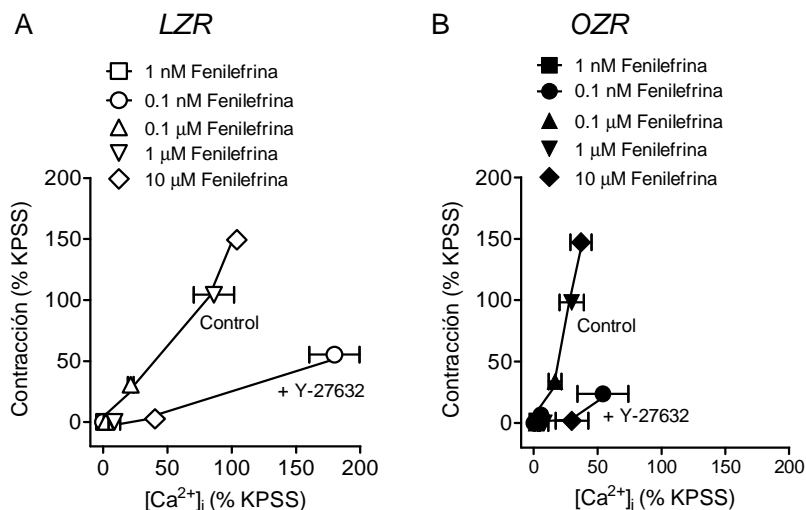
de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones submaximales de fenilefrina, como se ha había observado previamente en arterias peneanas de ratas Wistar (Figura 17), y un incremento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones maximales (Figura 46C y D). Así, la respuesta máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia y presencia del inhibidor fue de  $104 \pm 10 \%$  y un  $180 \pm 19 \%$  del KPSS ( $n = 5$ ), respectivamente. En los animales OZR, no se encontraron diferencias significativas en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto a las condiciones control (Figura 47C y D), siendo la respuesta máxima en presencia del inhibidor un  $54 \pm 20 \%$  del KPSS ( $n = 6$ ), respectivamente y en ausencia un  $37 \pm 8 \%$  del KPSS ( $n = 6$ ), respectivamente.



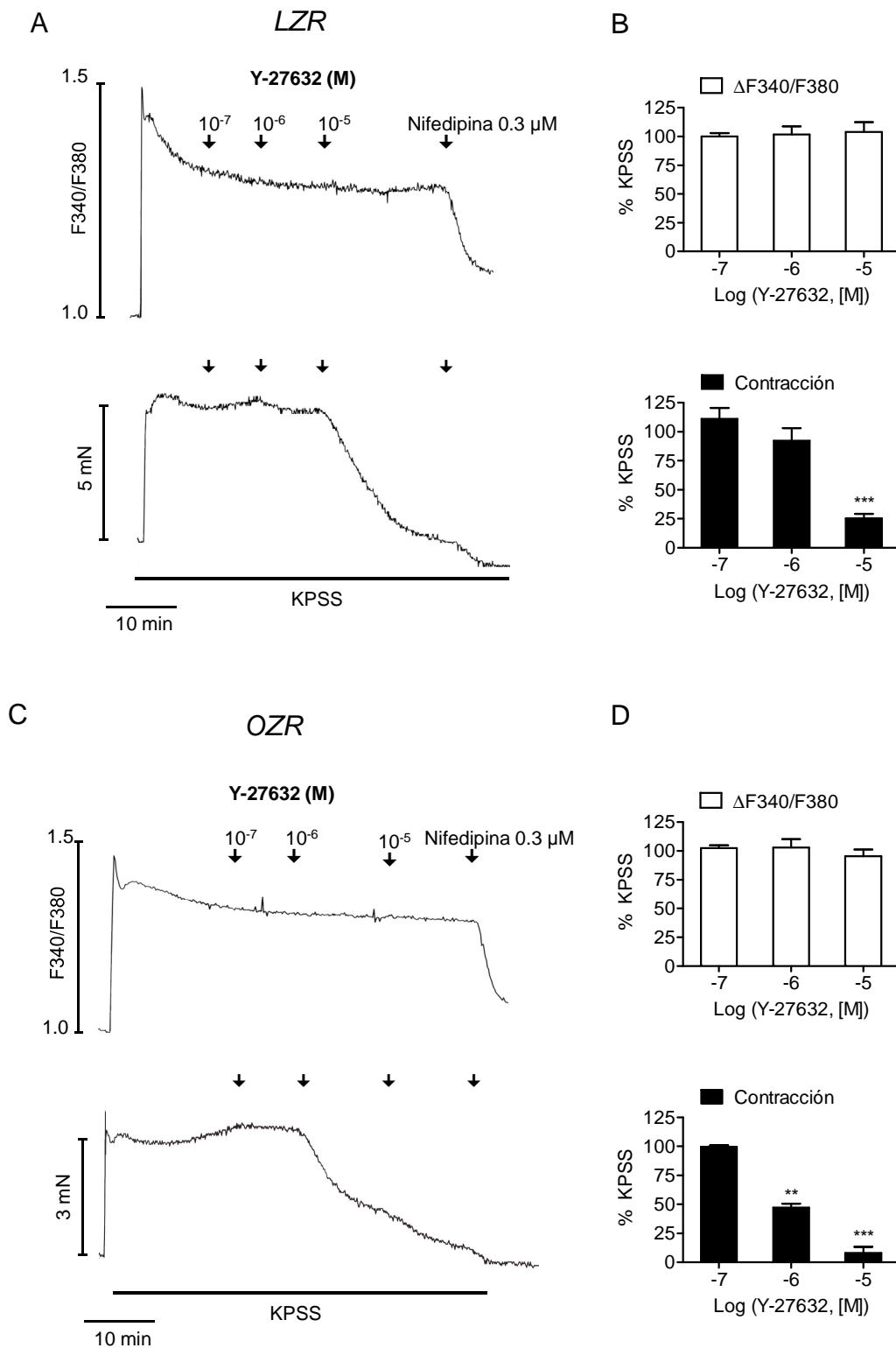
**Figura 46. El inhibidor Y-27632 reduce la tensión y posee un efecto dual sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en los animales LZR.** Medidas simultáneas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (arriba) y tensión (abajo) inducidos por (A) una solución despolarizante de  $\text{K}^+$  (125 mM, KPSS). Curva concentración respuesta para la fenilefrina en (B) condiciones control y (C) en presencia de Y-27632 (10  $\mu\text{M}$ ). (D) Resumen de los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (arriba) y en la tensión (abajo) en respuesta a la adición acumulativa de fenilefrina y bajo la inhibición de la RhoK. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 6-9 arterias. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$  vs LZR.



**Figura 47.** El inhibidor de RhoK Y-27632 abolió la tensión, pero no produjo diferencias significativas en la movilización de Ca<sup>2+</sup> inducida por la fenilefrina en las arterias peneanas de animales OZR. Medidas simultáneas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (arriba) y tensión (abajo) inducidos por (A) una solución despolarizante de K<sup>+</sup> (125 mM, KPSS). (B) Curva concentración respuesta para la fenilefrina en condiciones control y (C) en presencia de Y-27632 (10 μM). (D) Resumen de los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (arriba) y en la tensión (abajo) en respuesta a la adición acumulativa de fenilefrina y bajo la inhibición de RhoK. Los valores representan la media ± error estándar de 6-9 arterias.



**Figura 48.** Efecto de la inhibición de RhoK en las relaciones [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-tensión isométrica en respuesta a la fenilefrina en arterias peneanas de animales LZR y OZR. Los valores representan la media ± error estándar de 5-9 arterias.

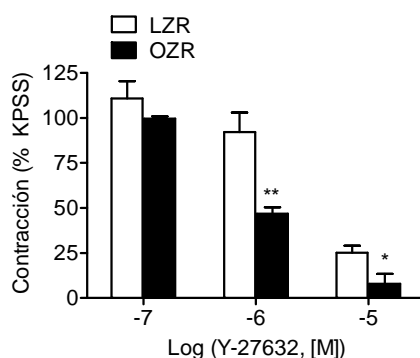


**Figura 49. El inhibidor de RhoK Y-27632 reduce con mayor potencia la tensión, pero no la  $[Ca^{2+}]_i$  en arterias despolarizadas con KPSS en ratas OZR.** Registros que muestran los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (arriba) y la respuesta contráctil (abajo) inducidos por Y-27632 en (A-B) LZR y (C-D) en OZR. (B y D) Valores medios que muestran los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión en respuesta a Y-27632. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 6 arterias. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ .



#### 4.3. Efecto de la inhibición de RhoK sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y la tensión inducidas por KPSS

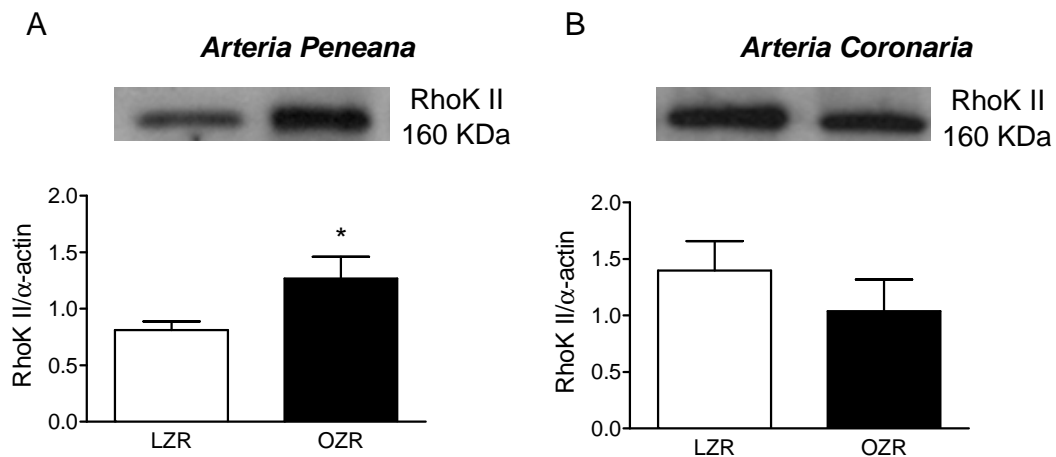
La Figura 49A y C muestra los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión en respuesta a KPSS ( $K^+$  125 mM), en presencia de fentolamina (0.3  $\mu$ M) para evitar los efectos de la liberación de noradrenalina de los nervios, en arterias peneanas de animales LZR y OZR, respectivamente. La despolarización con KPSS provocó un incremento rápido de tipo fásico seguido de una fase sostenida tanto en la  $[Ca^{2+}]_i$  como en la tensión sin mostrarse diferencias en ambos grupos de animales. Sin embargo, la inhibición de la contracción producida por Y-27632 no estuvo asociada con una reducción significativa en la  $[Ca^{2+}]_i$  en ambos grupos de animales (Figura 49) aunque el bloqueante de los canales dependientes de voltaje nifedipina (0.3  $\mu$ M) inhibió el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el KPSS en un  $58 \pm 10$  % ( $n = 5$ ) en los animales LZR y en un  $80 \pm 12$  % ( $n = 4$ ) en los OZR. Estos datos confirman la implicación de la RhoK en procesos de sensibilización al  $Ca^{2+}$  en arterias peneanas de ratas tanto LZR como OZR, si bien esta implicación fue mayor en los animales obesos, como se deduce de la mayor potencia y efecto máximo del inhibidor de la RhoK sobre las contracciones inducidas por el KPSS (Figura 50). La adición acumulativa de Y-27632 (0.1 – 10  $\mu$ M) sobre las arterias precontraídas con KPSS provocó una relajación dependiente de la concentración siendo esta inhibición a la dosis de 1  $\mu$ M de un  $8 \pm 4$  % ( $n = 6$ ) y un  $53 \pm 4$  % ( $n = 5$ ) para LZR y OZR, respectivamente (Figura 49 y 50).



**Figura 50. Las arterias peneanas de las ratas OZR son más sensibles a la inhibición de RhoK en arterias despolarizadas con KPSS.** Valores medios que muestran los efectos del Y-27632 sobre las contracciones inducidas por KPSS en arterias de animales LZR y OZR. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5-6 arterias. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .

#### 4.4. Determinación de la expresión de la enzima RhoK

La expresión de la isoforma II de RhoK se determinó mediante Western blotting en arterias peneanas y coronarias de ratas LZR y OZR (Figura 51). Así, se confirmó la expresión de dicha enzima en ambos lechos vasculares, siendo dicha expresión significativamente mayor en los animales OZR en el caso de las arterias peneanas. Sin embargo, en las arterias coronarias no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de animales.



**Figura 51. La expresión de la isoenzima RhoK II es superior en las arterias peneanas de los animales OZR.** Histograma que muestra la expresión de RhoK en (A) arterias peneanas ( $n = 11-13$ ) y (B) coronarias ( $n = 3-4$ ) de animales LZR y OZR. \*  $P < 0.05$  vs LZR.



## **V. DISCUSIÓN**



En el presente estudio se han investigado los mecanismos de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  implicados en la vasoconstricción del tejido eréctil peneano. Igualmente, se han caracterizado la estructura y la reactividad vascular peneanas en un modelo animal de Síndrome Metabólico o prediabetes, la rata Zucker obesa, con el fin de investigar posteriormente los cambios en el metabolismo de  $\text{Ca}^{2+}$  que tienen lugar en la pared arterial del animal diabético, así como determinar en qué medida dichos cambios contribuyen a la disfunción vascular peneana y, por tanto, a la disfunción eréctil asociadas a la diabetes.

Los resultados obtenidos demuestran que la vasoconstricción mediada tanto por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico como por el receptor TP depende en gran medida de la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular aunque también participan potentes mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ , estando en ambos procesos implicada la enzima RhoK. Las arterias peneanas de animales con Síndrome Metabólico presentan un remodelado vascular que se correlaciona con disfunción endotelial, y una vasoconstricción aumentada, en parte, debido a la alteración de la liberación basal de NO endotelial. Si bien no existen cambios marcados en la magnitud de la vasoconstricción mediada por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, existe un incremento significativo dependiente de RhoK de los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  de la maquinaria contráctil en los animales con Síndrome Metabólico, indicando cambios importantes en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$ , probablemente relacionados con los procesos de crecimiento y el remodelado de la pared vascular.

## **1. PAPEL DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA VASOCONSTRICCIÓN $\alpha_1$ -ADRENÉRGICA DE LAS ARTERIAS PENEANAS**

Los nervios simpáticos adrenérgicos son responsables de la detumescencia del pene erecto y también del mantenimiento de la flacidez mediante la liberación local de noradrenalina que contrae el músculo liso arterial y trabecular del pene fundamentalmente a través de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Andersson y Wagner, 1995; Andersson, 2001; Simonsen et al., 2002).

El presente estudio demuestra la existencia de diferentes mecanismos de señalización responsables de la vasoconstricción  $\alpha_1$ -adrenérgica peneana que

implican la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **1.1. Contribución de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ a la vasoconstricción arterial $\alpha_1$ -adrenérgica**

La contracción mediada por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico resultó ser muy dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a través de canales VOC tipo L y de canales no pertenecientes al tipo L. Los incrementos paralelos de la tensión y de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducidos por la fenilefrina sugieren que la vasoconstricción adrenérgica en las arterias peneanas está regulada principalmente por la elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 10). Así, la retirada del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular con objeto de determinar el grado de contribución de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, prácticamente abolió tanto la contracción como el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducidas por la fenilefrina, indicando la escasa movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares bajo la estimulación adrenérgica (Figura 10). Por otro lado, el pequeño incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  obtenido por la inhibición de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico con el ácido ciclopiazónico en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular indica el reducido almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  que poseen las arterias peneanas a diferencia de lo descrito para arterias de resistencia de otros lechos vasculares (Lagaud et al., 1999) (Figura 13). Estos resultados también difieren de los obtenidos en el cuerpo cavernoso humano y de la rata, donde la contribución de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la fenilefrina fue mayor (Thebault et al., 2003; Williams et al., 2005), lo cual sugiere diferencias en cuanto a los mecanismos de señalización intracelular acoplados al receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico entre el músculo liso trabecular y arterial del pene.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje tipo L es una de las principales vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo arterial, estando acoplada a la contracción del músculo liso, al llenado del retículo sarcoplásmico cuando éste se encuentra deplecionado y a la expresión génica (Hill et al., 2001). Además, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales ROC y SOC también contribuye a la vasoconstricción (McFadzean y Gibson, 2002). El antagonista selectivo de los canales tipo L nifedipina atenuó en un 50 % los incrementos de

la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la vasoconstricción inducidos por la fenilefrina, indicando así la implicación de los canales VOC de tipo L en la vasoconstricción arterial peneana.

Aunque la nifedipina redujo tanto la  $[Ca^{2+}]_i$  como la contracción, existió una fracción significativa de ambos parámetros resistente al bloqueo con este antagonista, lo que sugiere la contribución de canales de  $Ca^{2+}$  diferentes de los de tipo L. Estos canales podrían pertenecer a los ROC, canales acoplados a proteínas G que son activados por agonistas, y/o a los SOC, cuya apertura depende del vaciamiento previo del retículo sarcoplásmico (Albert y Large, 2006; McFaddean y Gibson, 2002; Parekh y Penner, 1997; Putney, 1990). La familia de las proteínas TRP, caracterizada recientemente y todavía bajo estudio, es una entidad estructural que participa tanto en la entrada de  $Ca^{2+}$  operada por receptor como en la operada por almacén en el músculo liso vascular incluyendo el de las arterias de resistencia (Albert y Large, 2006; Facemire y Arendshorst, 2005; Fleeming et al, 2003). La existencia de una subunidad potencialmente común para ambos tipos de canales (ROC y SOC), posiblemente explica las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas tan estrechamente relacionadas, así como la inconsistencia de los efectos descritos para los antagonistas de los canales ROC y los SOC en diferentes tipos celulares (Facemire y Arendshorst, 2005; Fleeming et al, 2003).

En el presente estudio, la participación de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de SOC se investigó mediante el vaciamiento pasivo del retículo sarcoplásmico bloqueando la bomba  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico con ácido ciclopiazónico y con el 2-APB bajo condiciones de bloqueo de los canales VOC de tipo L con nifedipina. El ácido ciclopiazónico se utilizó a una concentración que provocó una contracción rápida y variable, así como una elevación sostenida de la  $[Ca^{2+}]_i$ . La gran variabilidad en la respuesta contráctil del ácido ciclopiazónico no puede ser debida a su acción sobre las células endoteliales y la liberación de NO debido a que el efecto del ácido ciclopiazónico fue el mismo en arterias desprovistas de endotelio (Figura 12E). La contracción inducida por el ácido ciclopiazónico es dependiente de la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular a través de canales VOC y SOC (Figura 12). Así, el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por este agente fue reducido tras la retirada del  $Ca^{2+}$  del medio extracelular, lo que sugiere que el vaciamiento del retículo



sarcoplásmico activa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular. No parece que la elevación sostenida de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  causada por la inhibición de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico sea debida a una amortiguación reducida de la entrada basal de  $\text{Ca}^{2+}$ , pues dicha elevación fue inhibida significativamente por el antagonista putativo de los canales SOC 2-APB (Figura 15), lo que sugiere la existencia de una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo capacitativa. Además, se observó también un comportamiento claramente “capacitativo” en las arterias peneanas cuando tras el vaciamiento pasivo del retículo sarcoplásmico mediante la retirada del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular, se redujo el nivel basal de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figura 13). El influjo que se produce tras la restauración del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular probablemente refleja una pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  del depósito intracelular que eventualmente lleva a la activación de la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas observaciones indican que el contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares en las arterias peneanas tiene una elevada tasa de intercambio debido probablemente a su localización superficial y/o rápido intercambio con el del citosol, lo que confirmaría estudios previos que muestran cómo las arteriolas poseen un elevado flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana, y a su vez explicaría la elevada dependencia de los vasos de pequeño calibre del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Hynes y Duling, 1991; Potocnik y Hill, 2001).

Por otro lado, la reducción del efecto contráctil del ácido ciclopiazónico en presencia de nifedipina sugiere que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares es capaz de provocar despolarización y por tanto, apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L. Diversos estudios electrofisiológicos en células de músculo liso vascular han demostrado la existencia de una corriente de entrada a través de canales no selectivos de cationes, cuya actividad es modulada por el nivel llenado del almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (McDaniel et al., 2001; Ng y Gurney, 2001; Snetkov et al., 2003; Trepakova et al., 2001). Bajo condiciones fisiológicas, dichos canales pueden también conducir iones  $\text{Na}^+$ , lo que permitiría la despolarización de la membrana y la subsiguiente activación de los canales VOC. Este hecho, quizás explicaría la sensibilidad de la contracción inducida por el ácido ciclopiazónico a la nifedipina, lo que ha sido también demostrado en la arteria intrapulmonar de la rata (Ng y Gurney, 2001).

Por otra parte, nuestros resultados también revelan un desacoplamiento entre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales SOC y la contracción en condiciones de bloqueo de los canales VOC de tipo L. En presencia de nifedipina, la readición de  $\text{Ca}^{2+}$  después del vaciamiento del retículo sarcoplásmico con ácido ciclopiazónico indujo un incremento sostenido de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sin producir cambios en la tensión (Figura 14). Estudios previos han demostrado que la inducción de la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  con inhibidores de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico posee efectos variables sobre la tensión en diferentes preparaciones arteriales. Así, mientras este procedimiento provocó contracciones rápidas y marcadas en las arterias intrapulmonares (Ng y Gurney, 2001; Snetkov et al., 2003), en arterias como la aorta, carótida y femoral produjo contracciones inconsistentes y de pequeña magnitud (Sekiguchi et al., 1996; Nomura et al., 1997; Tosun et al., 1998) a pesar del incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La disociación entre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la contracción encontrada en las arterias peneanas estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en arterias pequeñas y arteriolas tales como la arteria mesentérica (Naganobu e Ito, 1994) y la arteriola pial del conejo (Flemming et al., 2002) y sugieren que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales operados por almacén es dirigida a un compartimento subcelular que tiene un acceso limitado al aparato contráctil. El acoplamiento entre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa y las funciones de tipo no contráctil en las células del músculo liso vascular ha sido relacionada con procesos de expresión génica (Flemming et al., 2002; Flemming et al., 2003). De hecho, la entrada capacitativa aumentada y la regulación a la alta de los canales TRP ha sido asociada con la proliferación celular en miocitos pulmonares humanos (Golovina, 1999) y se ha demostrado un incremento marcado en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de SOC en células musculares lisas de ratas hipertensas lo que sugiere un papel importante en el remodelado vascular (Fellner y Arendshorst, 2002).

El 2-APB es un compuesto inicialmente caracterizado como antagonista permeable del receptor de  $\text{InsP}_3$  (Maruyama et al., 1997), aunque estudios electrofisiológicos posteriores han demostrado que este agente bloquea tanto los canales SOC endógenos como canales TRP3 heterólogos expresados en células HEK293 (van Rossum et al., 2000). El efecto inhibitor del 2-APB sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por ácido ciclopiazónico en condiciones de bloqueo

de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L indica la contribución de los canales operados por almacén a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel del tejido arterial peneano (Figura 15A). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en miocitos intrapulmonares (Snetkov et al., 2003) y arteriolas del músculo esquelético (Potocnik y Hill, 2001) donde el 2-APB redujo tanto la corriente de entrada como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares con tapsigargina.

Además del efecto inhibitor sobre la entrada capacitativa activada por el ácido ciclopiazónico, el 2-APB redujo también la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por la fenilefrina a través de canales diferentes de los canales VOC tipo L (Figura 15B). Parece poco probable que la activación del adrenoceptor  $\alpha_1$  induzca el vaciamiento del retículo sarcoplásmico mediado por  $\text{InsP}_3$  y la apertura de SOC en las arterias peneanas, debido a que la retirada del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular abolió tanto la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como la tensión, lo que sugiere una escasa participación de los depósitos intracelulares en la contracción activada por la fenilefrina. Además, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa, al menos cuando es activada por el vaciamiento pasivo del retículo sarcoplásmico con inhibidores de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico, no está siempre acoplada a la contracción en las arterias peneanas. Por lo tanto, es probable que el efecto inhibitor del 2-APB sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la contracción de la fenilefrina resistentes a nifedipina, sea debido a un efecto bloqueante de este agente sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por receptor acoplada a la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, como se ha demostrado en el músculo liso arterial (Facemire y Arendshorst, 2005) y en células no musculares como son las células cancerosas epiteliales de la próstata (Thebault et al., 2003). Sugerimos que la vasoconstricción inducida por la activación del adrenoceptor  $\alpha_1$  en las arterias peneanas de la rata, es similar a la descrita en la vena porta del conejo en la que no está implicadas ni la ruta clásica del  $\text{InsP}_3$  ni la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el almacén intracelular, sino una participación de canales ROC activados por diacilglicerol a través de un mecanismo independiente de la PKC (Albert y Large, 2003; Albert y Large, 2006).

## 1.2. Papel de RhoK en la regulación de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ acoplada a la activación del receptor $\alpha_1$ -adrenérgico

La actividad fisiológica de la proteína RhoA y de su efector RhoK está involucrada en la de mantenimiento del estado de flacidez del pene. En el presente estudio se ha demostrado cómo la quinasa Rho no sólo desempeña un papel importante en el proceso clásico de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en el tejido eréctil, sino que también regula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de cationes no selectivos activados por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico en las arterias del peneanas de la rata.

Las terminaciones nerviosas simpáticas son las responsables del mantenimiento del estado de detumescencia del pene erecto a través de la liberación local de noradrenalina que provoca la contracción del músculo liso arterial y trabecular del pene (Andersson et al, 1995; Simonsen et al., 1997). Tanto la proteína RhoA como la quinasa Rho se expresan en el músculo liso cavernoso, y la inhibición de RhoK favorece la erección mediante la inhibición de la contracción a nivel arterial y trabecular del pene (Chitaley et al., 2001). En el presente estudio, la inhibición de RhoK redujo tanto las contracciones inducidas por la noradrenalina liberada de los nervios (Figura 16A y C) como las producidas por la activación selectiva de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos con fenilefrina (Figura 16B y D). Estos hallazgos son consistentes con trabajos previos realizados en el cuerpo cavernoso humano donde se demuestra que RhoK está implicada en el vía contráctil de la noradrenalina (Rees et al., 2001) y sugieren que el efecto erectogénico provocado *in vivo* por los inhibidores de RhoK (Chitaley et al., 2001) no es debido solamente a su acción relajante sobre el músculo liso trabecular, sino también al efecto vasodilatador potente sobre las arterias de resistencia peneanas.

En la contracción del cuerpo cavernoso intervienen potentes mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  atribuidos en su mayor parte a la elevada expresión de la proteína RhoA en comparación con otros músculos lisos (Wang et al., 2002). Esto, junto con el hecho de que los inhibidores de RhoK revierten la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  *in vitro* (Takahashi et al., 2003; Wang et al., 2002) y causan un aumento de la presión intracavernosa y de la erección *in vivo* (Chitaley et al., 2001), sugiere que la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RhoK contribuye al mantenimiento del estado de flacidez del pene. Sin embargo, los

resultados del presente estudio demuestran que en el tejido arterial del pene, RhoK no solamente está implicada en la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ , sino que también interviene en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática. Así, el inhibidor selectivo de la quinasa Y-27632 redujo notablemente el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por una concentración submaximal de fenilefrina (Figura 17) con una potencia inhibitoria ligeramente inferior a la descrita para la reducción de la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ , pero dentro del rango (micromolar) demostrado para la inhibición *in vitro* de la proteína asociada a RhoK p160 (Uehata et al., 1997). La falta de efecto por parte del inhibidor selectivo de la PKC sobre el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico descarta por una parte que los efectos del Y-27632 estén mediados por la PKC y confirma la selectividad de este compuesto sobre RhoK (Figura 18).

En el cuerpo cavernoso del conejo, Takahashi et al., (2003) no encontraron una inhibición significativa del Y-27632 sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la fenilefrina. Por lo tanto, nuestros resultados muestran por primera vez un papel para RhoK en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las arterias de resistencia peneanas que confirma las diferencias entre los mecanismos de señalización intracelular en los que interviene el  $\text{Ca}^{2+}$  en músculo liso trabecular y arterial del pene (Takahashi et al., 2003; Williams et al., 2005; Villalba et al., 2007).

Como se ha demostrado previamente en el presente estudio, la vasoconstricción  $\alpha_1$ -adrenérgica de las arterias de resistencia peneanas depende en gran medida de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales VOC de tipo L y de canales ROC (Villalba et al., 2007). El inhibidor de RhoK Y-27632 redujo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a la nifedipina inducida por la fenilefrina (Figura 19) sin afectar al aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por la despolarización con KCl, un estímulo clásico para la activación de los canales VOC (Figura 25). Estos datos sugieren inicialmente que la inhibición de RhoK suprime la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de cationes distintos de los canales VOC. El papel de RhoK en la regulación de la entrada de cationes se investigó mediante fluorescencia con  $\text{Ba}^{2+}$  ( $\text{BaCl}$ ), el cual proporciona una ventaja sobre el  $\text{Ca}^{2+}$ , debido a que ni es expulsado al exterior a través de bombas de membrana ni incorporado al interior de los almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de las ATPasas

(Kiselyov et al., 1999) y es prácticamente tan permeable como el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de cationes no selectivos (Parekh y Penner, 1997). El marcado efecto inhibitorio del Y-27632 sobre la entrada de  $\text{Ba}^{2+}$  resistente a la nifedipina bajo la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico confirma que la inhibición específica de RhoK afecta a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de cationes no selectivos y no a mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  o salida de  $\text{Ca}^{2+}$ . Debido a que la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico no promueve la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el tejido arterial peneano (Villalba et al., 2007), parece poco probable que el Y-27632 tenga un efecto inhibitorio sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales SOC. Además, la inhibición de la RhoK no alteró la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por el ácido ciclopiazónico, pues la readición de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de vaciamiento de los depósitos intracelulares con ácido ciclopiazónico y bajo el bloqueo de los canales VOC con nifedipina no fue modificada por Y-27632 (Figura 21).

Estos resultados sugieren, por tanto, que RhoK interviene en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un canal ROC, y serían consistentes con los hallazgos en el músculo liso de la tráquea (Ito et al., 2002) y en la aorta y las arterias mesentéricas de rata (Ghisal et al., 2003), en los que se demuestra que RhoK regula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo la activación de receptores muscarínicos y  $\alpha_1$ -adrenérgicos, respectivamente. Sin embargo, esta participación es, probablemente, diferente según el tipo de receptor y/o el lecho vascular ya que la inhibición de RhoK no alteró significativamente el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  evocado por el tromboxano  $\text{A}_2$  en la arteria coronaria porcina (Nobe y Paul, 2001) o en las arterias pulmonares (Cogolludo et al., 2005).

Numerosos miembros de la familia TRPC actúan como canales de cationes permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  que pueden ser activados en respuesta a la estimulación de receptores acoplados a proteínas G ( $\text{G}_{q/11}$ ) (Dietrich et al., 2006; Inoue et al., 2001). El subtipo TRPC6 se expresa en células de músculo liso vascular y se ha correlacionado con un canal catiónico no selectivo activado por el  $\alpha_1$ -adrenoreceptor en miocitos de la vena porta (Albert y Large et al., 2003; Inoue et al., 2001) y de la arteria mesentérica (Hill et al., 2006) del conejo. Por otra parte, el TRPC6 y una de sus variantes (TRPC6 $\alpha$ ) se expresa en miocitos humanos de cuerpo cavernoso (So et al., 2005), y, por tanto, este

subtipo podría ser un candidato molecular para el canal de cationes no selectivos activado por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico y regulado por RhoK en las arterias del pene y además éste se expresa en dicho tejido (Figura 22A). Sin embargo, las proteínas TRPC pueden formar canales heteroméricos y homoméricos (Dietrich et al., 2006) y, por tanto, se precisarían de estudios moleculares y funcionales para determinar la expresión de otras subunidades TRPC diferentes y subtipos de canales, así como su posible contribución a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y su regulación específica por RhoK en las arterias peneanas.

### 1.3. Mecanismos de sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ activados por el receptor $\alpha_1$ -adrenérgico

A pesar de que la vasoconstricción en las arterias peneanas es altamente dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular, nuestros resultados también muestran la existencia de potentes mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, el desarrollo sostenido de la tensión generado por la estimulación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos con fenilefrina a una concentración determinada de  $\text{Ca}^{2+}$  fue mayor en comparación con la contracción inducida por la despolarización con KCl a esa misma concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 9). Por otra parte, la aplicación en el presente estudio de inhibidores selectivos de distintas proteína quinasas en las arterias permeabilizadas con  $\alpha$ -toxina en las que se fija la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , demuestra que en la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico están implicados mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentran mediados por la PKC, tirosina quinasa y RhoK (Figura 24).

La sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  para el desarrollo de fuerza contráctil encontrado en las arterias peneanas permeabilizadas ( $\text{pEC}_{50}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  600 nM) se encuentra en el rango previamente descrito para músculos lisos tónicos (arterias pulmonar y femoral) y fásicos (como la vena porta y el íleon) (Kitazawa et al., 1991). Esta sensibilidad fue notablemente aumentada por el GTP- $\gamma$ -S, indicando el papel de las proteínas G en la vía de señalización que activan los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ . La estimulación con fenilefrina en presencia de GTP- $\gamma$ -S y concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  umbrales provocó una contracción sostenida cercana a la respuesta contráctil máxima de este tejido,

lo que sugiere que la activación selectiva del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico está acoplado a las vías de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ . Está bien establecido que este incremento en la generación de fuerza ante concentraciones umbrales de  $\text{Ca}^{2+}$  está asociado con incrementos paralelos en la fosforilación de la  $\text{MLC}_{20}$  y puede ser controlada por la inhibición de la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina en el músculo liso vascular (Somlyo y Somlyo, 2000). La participación de la PKC y RhoK en la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  está bien documentada en las arterias de varios lechos vasculares (Martínez et al., 2000; Somlyo y Somlyo, 2000; Facemire y Arendshorst, 2005), y que tanto RhoK como PKC pueden inhibir a la MLCP mediante la fosforilación de la subunidad MYPT de la MLCP y el CPI-17, respectivamente (Eto et al., 2001; Somlyo y Somlyo, 2000).

Por otra parte, diferentes evidencias durante la última década sugieren que la proteína quinasas activada por mitógenos (MAPK quinasas), que a su vez pueden ser regulada por tirosina quinasas, juega un papel importante en la modulación de la contracción del músculo liso vascular además de su papel en la transducción de señales desde receptores localizados en la membrana plasmática hasta los eventos de transcripción nuclear (Toma et al., 1995; Dessy et al., 1998; Martínez et al., 2000; Ohanian et al., 2001). En el presente estudio, la inhibición provocada por los inhibidores selectivos Gö6983, tyrphostin A18, y fasudil sobre las arterias permeabilizadas demuestra un papel para la PKC, tirosina quinasa, y RhoK, respectivamente, en los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  subyacente a la vasoconstricción  $\alpha_1$ -adrenérgica (Figura 24).

#### **1.4. Implicación de RhoK en los mecanismos de sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ activados por el receptor $\alpha_1$ -adrenérgico**

La importancia de los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por RhoK en la fisiología del tejido eréctil del pene ha sido destacada en investigaciones que demuestran que la inhibición de RhoK en un modelo *in vivo* aumentó notablemente la presión intracavernosa y condujo a la erección (Chitaley et al., 2001; Wang et al., 2002) y tanto RhoK y como otras quinasas involucradas en la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en el tejido eréctil representan un potencial terapéutico para el tratamiento de la disfunción eréctil orgánica.



Debido a que RhoK constituye un factor determinante en la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso del tejido eréctil (Wang et al., 2002), y una vez determinado su papel en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , en el presente estudio se evaluó la contribución de esta quinasa a los cambios en la fuerza independientes de la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  en las arterias del pene en arterias permeabilizadas con  $\alpha$ -toxina. Tanto la activación directa de las proteínas G con GTP- $\gamma$ -S como la del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico con fenilefrina en presencia de GTP- $\gamma$ -S y de una concentración umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  produjeron contracciones similares o incluso mayores a las provocadas por la concentración maximal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 26A y B). Esta observación está de acuerdo con la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  inusualmente elevada que se encuentra en el cuerpo cavernoso humano y del conejo y es consistente con la mayor expresión de RhoA y RhoK en el tejido eréctil en comparación con otros músculos lisos (Wang et al., 2002). En consistencia con estas observaciones, el Y-27632 inhibió completamente la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  inducida tanto por la activación específica del receptor adrenérgico como no específica en arterias permeabilizadas del pene. Además, el efecto inhibitorio escaso del Y-27632 sobre las contracciones inducidas por una estimulación única con  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 26C) es consistente con su alta selectividad sobre RhoK en comparación con MLCK.

Aunque la quinasa Rho es activada por agonistas a través de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas ( $G_{\alpha 12/13}$ ) (Gohla et al., 2000), estudios recientes han demostrado que la participación de la activación de RhoK en la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  también puede ser activada por la despolarización de la membrana (Mita et al., 2002; Sakurada et al., 2003; Urban et al., 2003). En el presente estudio, el Y-27632 redujo la tensión de manera dependiente de la concentración, pero no el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por KCl (Figura 25), lo que sugiere que la RhoK participa en la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la despolarización celular y confirma así trabajos anteriores en liso arterial músculo de distintos lechos vasculares (Mita et al., 2002; Sakurada et al., 2003; Urban et al., 2003). El efecto inhibitorio del Y-27632 sobre las contracciones tanto en arterias permeabilizadas en las la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se fija como en las provocadas por la despolarización con KPSS en las arterias intactas sugiere que en la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RhoK están implicados

mecanismos tanto independientes como dependientes de la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esto a su vez puede explicar la implicación de los mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en la vasoconstricción inducida por la activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en las arterias peneanas que es altamente dependientes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, como se demuestra en el presente estudio (Villalba et al., 2007). Así, se ha sugerido que vasoconstrictores fisiológicos que actúan sobre receptores acoplados a proteínas G utilizan una vía de señalización dual, es decir, la asociada a la proteína  $G_{\alpha_{12/13}}$  y la vía dependiente de  $\text{Ca}^{2+}/G_q$  que media la activación del mecanismo de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  a través de RhoA/RhoK (Sakurada et al., 2003).

En resumen, estos resultados demuestran que la implicación de mecanismos tanto independientes como dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación mediada por RhoK de la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de las arterias peneanas. Se demuestra, además, un papel de la RhoK en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de cationes no selectivos acoplada al receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, lo que probablemente contribuye a la regulación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RhoK de la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de la maquinaria contráctil. La identificación molecular futura de la isoforma de RhoK, así como de la subfamilia/s TRP a las que pertenecen las proteínas del canal ROC permitiría el desarrollo de inhibidores más selectivos de la vasoconstricción arterial peneana como futuras alternativas terapéuticas en la disfunción eréctil, minimizando los efectos no deseados en otros lechos vasculares.

## **2. PAPEL DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA VASOCONSTRICCIÓN ASOCIADA A LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR TP EN ARTERIAS PENEANAS**

### **2.1. Contribución de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ a la vasoconstricción arterial mediada por el receptor TP**

La vía de señalización intracelular de la vasoconstricción inducida por el  $\text{TXA}_2$  se ha descrito tanto en las plaquetas como en el músculo liso e implica la activación de la PLC a través de una proteína  $G_q$ , la subsiguiente producción de diacilglicerol e  $\text{InsP}_3$  y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de receptores sensibles

a  $\text{InsP}_3$  localizados en el retículo sarcoplásmico (Hirata et al., 1991). Como se esperaba, tanto el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como la contracción inducidas por el análogo del  $\text{TXA}_2$ , U46619, en arterias peneanas fueron abolidas por el antagonista selectivo de los receptores TP, SQ29548, indicando que esas respuestas están mediadas por dicho receptor (Figura 27). Al igual que lo demostrado previamente en este estudio para el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, la respuesta mediada por el U46619 también requiere un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el que están implicados varios mecanismos. Durante esta serie de experimentos se investigaron las vías principales (flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por receptores de  $\text{InsP}_3$ ) en respuesta a la activación del receptor TP por el U46619, que produce un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Investigaciones iniciales llevadas a cabo en músculo liso arterial han descrito que la contracción inducida por el U46619 en las arterias pulmonares está mediada por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares siendo esta vía suficiente para conseguir la contracción del músculo liso (Himpens et al., 1990). Nuestros resultados demuestran que la contracción mediada por el receptor del  $\text{TXA}_2$  depende de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, ya que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular el U46619 provocó contracciones de gran magnitud las cuales se suprimieron completamente después de la eliminación de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio. Por otra parte, cuando las arterias se mantuvieron en *solución nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$*  el U46619 no provocó contracción ni aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , lo que indica que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos de almacenamiento intracelular juega un escaso papel en la respuesta contráctil mediada por el receptor TP. Con el protocolo utilizado en el presente estudio, se asume que no hay efecto del tratamiento sobre los depósitos intracelulares cuando las arterias se incuban en el medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual contiene EGTA y se supone así que los almacenes intracelulares permanecen intactos en estas condiciones. Una segunda evidencia para apoyar la falta de papel de los almacenes intracelulares es que el ácido ciclopiazónico no afectó a las contracciones inducidas por el U46619, por lo que el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular no parece participar en la contracción producida por este agonista, mientras que la elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  depende principalmente del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana.

Estudios previos indican que las respuestas mediadas por el U46619 pueden ser atenuadas o abolidas como consecuencia del bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Seeger et al., 1987; Tosun et al., 1998; Ding y Murray, 2005). En el presente estudio en primer lugar se estudió la participación de los canales VOC mediante la inhibición con nifedipina. Dicho agente inhibió parcialmente tanto la contracción como el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducidos por el U46619, lo que sugiere que mientras que una fracción de la respuesta del U46619 depende de la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, existen otras vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que también contribuyen a dicha respuesta. Con el fin de estudiar la contribución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de otras vías, se evaluaron los efectos del 2-APB, bloqueante no selectivo de canales de cationes. Este agente redujo los aumentos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y de la contracción producidos por U46619. Los canales ROC también contribuyen a la señalización mediada por los receptores TP activados por el U46619 en el tejido eréctil puesto que el SKF96365 abolió la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la contracción activadas por el U46619 resistentes al bloqueo con nifedipina. Una conclusión similar ha sido descrita en otros lechos vasculares (Tosun et al., 1998; Snetkov et al., 2006). Por otra parte, se han descrito también otros mecanismos responsables del incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta a la estimulación del receptor TP con U46619. Así, en las arterias pulmonares de la rata, el U46619 inhibe los canales  $\text{K}_v$ , permitiendo la despolarización celular, la activación de los canales VOC y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que median la vasoconstricción mediante una vía dependiente de la PKCzeta (Cogolludo, et al., 2003).

Se sabe que el retículo sarcoplásmico es el orgánulo más importante en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Sin embargo, no participa exclusivamente en la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la activación del receptor. Diferentes estudios demuestran el papel de la mitocondria en la regulación de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso vascular mediante la modulación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y los transportadores de membrana (Poburko et al., 2004). Se ha propuesto una integración funcional entre la mitocondria y el retículo sarcoplásmico, así como una difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  entre ellos. Las investigaciones de Szado y col. (2003) sugieren que la mitocondria está localizada superficialmente cerca del retículo sarcoplásmico, el cual se comunica con el espacio extracelular a través del intercambiador

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados de este estudio realizado en células de músculo liso de aorta muestran que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  mitocondrial ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ) fue bloqueado por el ácido ciclopiazónico y la tapsigargina pero no por la nifedipina, demostrando que el  $\text{Ca}^{2+}$  suministrado a la mitocondria procede del retículo sarcoplásmico y no hay flujo a través de canales VOC que contribuye a un aumento local de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estudios y métodos adicionales capaces de evaluar la compartimentación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las células del músculo liso bajo la estimulación de los receptores TP con agonistas selectivos serían necesarios para confirmar esta cuestión.

## 2.2. Mecanismos de sensibilización al $\text{Ca}^{2+}$ activados por el receptor TP

Como se ha discutido previamente, no sólo el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sino también la modulación de la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  es un mecanismo importante para inducir una respuesta contráctil y en él, la vía RhoA/RhoK tiene un papel esencial. RhoK, activada por la forma unida a GTP de la proteína RhoA, regula la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de las proteínas contráctiles mediante el control de la actividad de la MLCP por fosforilación en varios tipos de músculos lisos incluido el músculo liso vascular (Kimura et al., 1996). La vía de RhoA/RhoK participa en el mantenimiento de la contracción del músculo liso arterial y trabecular del pene, y por lo tanto su antagonismo estimula la erección de una forma independiente del NO o GMPc (Chitaley et al., 2001).

El hecho que la respuesta contráctil inducida por el U46619 sea inhibida por el Y-27632 pone de manifiesto la existencia de mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en las arterias peneanas. El papel de RhoK en la regulación del proceso de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido descrito en otros lechos vasculares (Martínez et al., 2000; Janssen et al., 2001; Tazzeo et al., 2003) y en el presente estudio se demuestra su participación en la vasoconstricción mediada por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico en las arterias peneanas. En lo que respecta al receptor TP, el Y-27632 inhibió notablemente la tensión inducida por el U46619 con sólo una pequeña disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figura 30) lo que demuestra que RhoK modula principalmente la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y descarta un efecto posible sobre la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  demostrada para la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico. No se puede descartar un papel para la RhoK regulando la actividad de los

canales iónicos. Así, la existencia de un vínculo entre RhoK y canales de  $K^+$  bajo la activación de los receptores TP, que provocan la despolarización de la membrana y posterior activación de los canales VOC ha sido previamente demostrada para los nucleótidos de pirimidina (Luykenaar et al., 2004). Asimismo, la fosforilación de una subunidad de los canales VOC ha sido propuesto como mecanismo para las contracciones inducidas por el U46619 en la arteria caudal de la rata (Wilson et al., 2005).

El último paso en la vía intracelular de la contracción del músculo liso es la fosforilación de la  $MLC_{20}$ . Cuando RhoK está activada inhibe a MLCP, resultando un mayor nivel de fosforilación de la misma y contracción en ausencia de cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  lo cual define la sensibilización al  $Ca^{2+}$ . En el presente estudio, se determinaron tanto el nivel de fosforilación como la fuerza de contracción inducidos por el U46619 en las arterias peneanas. La fosforilación de la  $MLC_{20}$  inducida por el U46619 y la fuerza fueron inhibidas por el inhibidor de RhoK Y-27632 (Figura 31). Estudios previos han demostrado que la PKC está implicada también en la sensibilización al  $Ca^{2+}$  y provoca un aumento de la contracción del músculo liso (Somlyo y Somlyo, 2003). En nuestro estudio, el inhibidor de la PKC Ro31-8220 tuvo un efecto tanto sobre la contracción como sobre la fosforilación de la  $MLC_{20}$  producidos por el análogo del  $TXA_2$  U46619, lo que sugiere un papel para la PKC en la contracción del músculo liso del pene bajo la activación del receptor TP. Tanto RhoK como PKC aumentan el grado de fosforilación de la  $MLC_{20}$  y ambos mecanismos (RhoK y PKC) convergen en la  $MLC_{20}$ . Hemos encontrado una inhibición incompleta de la fosforilación de la  $MLC_{20}$  mediante la inhibición de RhoK y de la PKC lo que probablemente indica la participación de otras quinasas tales como las TKs, como hemos demostrado previamente bajo la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico (Villalba et al., 2007) y del propio receptor TP (Villalba et al., 2010).

En el presente estudio se encontró que el Ro31-8220 redujo significativamente la contracción y el nivel de fosforilación de la  $MLC_{20}$  en la arteria dorsal del pene. Se ha demostrado que la participación de la PKC en las contracciones inducidas por la fenilefrina y por el U46619 parece depender del tamaño arterial; Así, Budzyń y col. (2006) demostraron que las respuestas contráctiles de los vasos de mayor calibre (aorta torácica y mesentérica

superior) estaban mediadas por la PKC y RhoK, mientras las de los vasos de menor diámetro (ramas de segundo orden de la arteria mesentérica superior) fueron mediadas exclusivamente por la PKC. En el cuerpo cavernoso sin embargo, y a diferencia de las arterias del pene, Ro31-8220 no inhibió de manera significativa ni la fosforilación de la MLC<sub>20</sub> ni la MYPT en el cuerpo cavernoso determinado a través de Western blotting. Esto sugiere un papel diferente para la PKC en el tejido vascular arterial y trabecular del pene. Nuestros resultados están de acuerdo con un estudio reciente, donde los activadores e inhibidores de la PKC no mostraron ningún efecto sobre las respuestas contráctiles inducidos por el U46619 o por fenilefrina en cuerpo cavernoso de ratón, mientras que se observó un papel importante para la PKC en la aorta del ratón (Jin et al., 2008). Por otra parte, la inhibición de la PKC no alteró la contracción inducida por el U46619 en el cuerpo cavernoso humanos obtenido de pacientes no diabéticos, pero produjo un desplazamiento hacia la derecha en la CCR del U46619 en el tejido eréctil diabético (Angulo et al., 2006). En conjunto, y en contraste con la arteria dorsal del pene, la falta de cambio en el nivel de P-MLC o P-MYPT en el tejido del cuerpo cavernoso tras la estimulación con U46619 sugiere que la PKC no participa en los procesos de sensibilización al Ca<sup>2+</sup> acoplados a la activación del receptor TP en el tejido del cuerpo cavernoso en condiciones fisiológicas, pero podrían estar implicados en la disfunción eréctil diabética.

### **3. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DEL Ca<sup>2+</sup> EN LA VASCULOPATÍA DIABÉTICA PENEANA**

En la segunda parte del presente estudio se caracterizó el modelo para el estudio de las variaciones del metabolismo del Ca<sup>2+</sup> en la vasculopatía diabética peneana. Inicialmente se evaluaron comparativamente las características estructurales y funcionales de las arterias peneanas y coronarias en RZO, modelo animal de resistencia a la insulina o Síndrome Metabólico, partiendo de las observaciones de estudios clínicos previos que demuestran que la disfunción eréctil es a menudo un signo centinela de la enfermedad vascular y además ha sido propuesta como un marcador potencial de enfermedad arterial coronaria silente en varones diabéticos (Gazzaruso et al., 2004). La hipótesis del estudio fue que en una determinada etapa durante

el curso de la diabetes, deben existir diferencias marcadas en la función vascular entre el lecho arterial peneano y el coronario ya que la disfunción eréctil es clínicamente evidente cuando la enfermedad arterial coronaria es ausente o silenciosa en pacientes diabéticos.

Se utilizaron animales OZR, un modelo genético bien establecido de resistencia a la insulina/Síndrome Metabólico causados por un gen disfuncional del receptor de leptina. Estos animales presentan intolerancia a la glucosa, obesidad e hiperlipidemia, condiciones que suelen anticipar el establecimiento de la diabetes tipo 2. Nuestros resultados demuestran alteraciones profundas en la estructura, una reactividad vascular alterada y la existencia de disfunción endotelial en el caso de las arterias peneanas de los animales OZR de 17-18 semanas de edad, mientras que en las arterias coronarias de los mismos animales, la estructura se encuentra conservada y se observa una vasoconstricción aumentada probablemente debido a la disfunción endotelial subyacente.

### **3.1. Cambios estructurales en arterias peneanas de animales con Síndrome Metabólico**

Se considera el remodelado vascular como un signo característico de los trastornos vasculares asociados al Síndrome Metabólico y a la diabetes mellitus. El presente estudio demuestra alteraciones estructurales profundas en las arterias peneanas en un modelo animal de prediabetes, como se refleja en los resultados procedentes del análisis morfométrico donde la relación media-lumen se encuentra aumentada en los animales OZR (Figura 33C). Esto se debe al estrechamiento de la luz del vaso y al incremento del grosor de la capa media (Figura 33A), lo que sugiere remodelado vascular de tipo hipertrófico. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en las arterias coronarias de orden similar de los animales OZR, lo que sugiere una estructura vascular conservada. Recientemente se ha demostrado mediante técnicas de ultrasonidos no invasivos llevadas a cabo en mujeres de mediana edad asintomáticas con Síndrome Metabólico, que tanto el diámetro luminal como el flujo sanguíneo se encuentran preservados en respuesta a un engrosamiento de la pared arterial (Iannuzzi et al., 2005). Por otra parte, se ha demostrado consistentemente que las arteriolas de resistencia del músculo esquelético de



OZR sufren remodelado, que da lugar a una disminución del diámetro arterial y de la distensión; sin embargo, en dichas arterias se observa también un descenso del grosor de la capa media, todo ello indicativo de un remodelado vascular de tipo atrófico (Frisbee et al., 2003; Stepp et al., 2004).

Nuestros resultados obtenidos en las arterias peneanas de animales OZR están de acuerdo con los descritos previamente en las arterias de resistencia subcutáneas de pacientes diabéticos tipo 2, los cuales muestran remodelado hipertrófico con un diámetro luminal reducido y una relación media-lumen incrementada (Rizzoni et al., 2001). Diversas complicaciones vasculares durante la diabetes y los daños correspondientes en diferentes órganos están asociados con el remodelado vascular en diferentes lechos vasculares como el de la retina, el renal y el mesentérico. Los cambios estructurales en las arterias peneanas de los animales OZR por tanto, podrían estar relacionados con la disfunción eréctil que se presenta en este modelo animal (Kovanecz et al., 2006; Wingard et al., 2007) y con la alta incidencia de disfunción eréctil en el Síndrome Metabólico y en pacientes diabéticos (Hakim y Goldstein, 1996; Vickers y Wright, 2004; Esposito et al., 2005).

En la hipertensión, se ha demostrado la existencia de remodelado vascular tanto en las arterias pudendas, a través de las cuales tiene lugar la irrigación del pene, como en otras estructuras peneanas, y en base a estos hallazgos la terapia con antihipertensivos ha sido propuesta tanto para el tratamiento a largo plazo de la disfunción eréctil como para la reducción del riesgo de padecer la misma (Toblli et al., 2000; Hale et al., 2009). Curiosamente, en el modelo animal de ratas Zucker obesas, la disfunción venooclusiva está asociada con una disminución de la relación células de músculo liso-colágeno y la fibrosis del tejido eréctil (Kovanecz et al., 2006). Por otro lado, un estudio reciente realizado en ratones diabéticos tipo 2 (*db/db*) demostró alteraciones en la matriz en el cuerpo cavernoso, asociándose el contenido de colágeno y elastina con la alteración del mecanismo venooclusivo y con la respuesta eréctil reducida encontrada en estos animales (Luttrell et al., 2008). Por lo tanto, la existencia de remodelado vascular en el tejido eréctil del pene, tanto a nivel arterial como trabecular, se correlaciona con disfunción eréctil durante el Síndrome Metabólico y la diabetes tipo 2 (Kovanecz et al., 2006, Luttrell et al., 2008).

Se ha sugerido que anomalías metabólicas tales como la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, desempeñan un papel importante en la génesis de las alteraciones estructurales observadas en la diabetes mellitus. Así, la insulina promueve el crecimiento en las células vasculares (Ridray, 1995) y se ha demostrado una correlación entre los niveles de insulina plasmática y la relación media-lumen en las arteriolas de pacientes diabéticos tipo 2 (Rizzoni et al., 2001). Por otro lado, el aumento de la producción local de factores vasoactivos como la endotelina-1 también puede contribuir al desarrollo de remodelado vascular en la diabetes (Harris et al., 2005). El modelo de ratas Zucker obesas (OZR) utilizado en el presente estudio muestra una leve hiperglucemia e hiperinsulinemia, con un perfil lipídico alterado (Tabla 4). Sin embargo, bajo estas mismas condiciones metabólicas, la estructura se ha conservado en las arterias coronarias a diferencia de las arterias peneanas, lo que sugiere que otros factores además de los metabólicos, pueden estar implicados en la génesis del remodelado vascular que se observa en el lecho arterial peneano.

Estudios previos realizados en animales OZR han sugerido que el remodelado vascular refleja la reducción del flujo sanguíneo secundaria a la reactividad vascular alterada (Frisbee et al., 2003; Stepp et al, 2004). La disminución de la biodisponibilidad de NO y de las relajaciones dependientes del endotelio, han sido asociadas con el remodelado vascular en la arterias de resistencia de animales OZR (Bouvet et al., 2007). De acuerdo con estas observaciones, las anomalías estructurales encontradas en el presente estudio se asocian con la disfunción endotelial severa presente en las arterias peneanas, mientras que la estructura se ha conservado en el lecho arterial coronario que, por otro lado, muestra una disfunción endotelial moderada en los mismos animales OZR. Un hallazgo interesante del presente estudio es que tanto la reactividad vascular como la estructura estuvieron deterioradas en las arterias peneanas de animales con Síndrome Metabólico antes de la aparición de hipertensión y a diferencia de lo que se ha demostrado recientemente en las arterias cerebrales en este modelo animal, donde el remodelado vascular, el incremento del tono miogénico y un mayor riesgo de accidente cerebrovascular se correlacionaron con el desarrollo de hipertensión arterial (Osmond et al, 2009). Nuestros resultados obtenidos en las arterias peneanas de animales

OZR refuerzan, por tanto, el concepto de que la disfunción eréctil es un signo temprano de enfermedad vascular subclínica (Sullivan et al., 1999).

### **3.2. Vasoconstricción alterada en arterias de animales con Síndrome Metabólico**

La existencia de una vasoconstricción anormal debida bien al aumento de la contractilidad muscular, bien a la presencia de disfunción endotelial, ha sido demostrada previamente en arterias de pacientes con diabetes tipo 2 y en diferentes modelos animales de diabetes y Síndrome Metabólico (Frisbee et al., 2004; Okon et al., 2005; Wingard et al., 2007; Luttrell et al., 2008). Nuestros datos demuestran una mayor vasoconstricción tanto en arterias peneanas como en coronarias de animales OZR, la cual parece ser debida a la disfunción endotelial más que a una contractilidad aumentada de las células musculares lisas. Así, las contracciones inducidas tanto por la EET y por la noradrenalina en arterias peneanas, como por la serotonina en arterias coronarias fueron mayores en animales OZR (Figura 34), mientras que las inducidas por la despolarización con una solución rica en  $K^+$  (KPSS) estuvieron bien disminuidas, en el caso de las arterias peneanas, o inalteradas en el de las coronarias de animales OZR (Figura 35A), descartando así una actividad contráctil aumentada del músculo liso. La reducción de la magnitud en términos de valores absolutos de la respuesta contráctil inducida tanto por el KPSS como por la noradrenalina en las arterias peneanas de OZR probablemente refleja el menor tamaño de estas arterias debido al remodelado, aunque en términos de sensibilidad, la vasoconstricción noradrenérgica estuvo aumentada en los animales OZR (Figura 35C-F).

### **3.3. Disfunción endotelial en arterias de animales con Síndrome Metabólico**

Diversos estudios han observado que tanto las respuestas vasoconstrictoras a la noradrenalina liberada de los nervios (Carneiro et al., 2008; Luttrell et al., 2008) como las mediadas por agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Luttrell et al., 2008, Wingard et al., 2007) se encuentran aumentadas en el cuerpo cavernoso de animales OZR y en ratones diabéticos tipo 2, anomalía que ha sido atribuida tanto a mecanismos de acción presináptica como

postsináptica. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que los niveles basales de NO parecen ser insuficientes para contrarrestar la vasoconstricción aumentada, tanto en las arterias peneanas como en las coronarias de los animales OZR. Así, el bloqueo de la enzima NOS no aumentó las contracciones inducidas ni por la EET ni por la estimulación con agonistas exógenos como noradrenalina o la serotonina en estos animales, a diferencia de lo observado en las arterias de animales control en los que la inhibición de la síntesis de NO aumentó de forma significativa las contracciones inducidas por la EET y la noradrenalina en las arterias peneanas y por la serotonina en arterias coronarias, igualando así las respuestas contráctiles en animales LZR y OZR (Figuras 37 y 38). Estos resultados estarían de acuerdo con observaciones recientes en arterias de pacientes diabéticos tipo 2, donde el deterioro basal en la liberación de NO aumenta la actividad de la vasoconstricción adrenérgica (Okon et al., 2005), y también en las arteriolas del músculo esquelético de ratas Zucker prediabéticas y diabéticas, donde una reducción en la señalización mediada por el NO aumenta la reactividad a la noradrenalina y a la endotelina-1 y precede al desarrollo de la diabetes y a la aparición de hipertensión arterial (Lesniewski et al., 2008). El menor efecto potenciador sobre la vasoconstricción observado tras el bloqueo de la NOS en las arterias peneanas de animales LZR en comparación con las arterias coronarias, está probablemente relacionado con la diferente regulación del tono vascular por factores vasoactivos endoteliales en ambos lechos, y debido a los correspondientes cambios de adaptación después de la inhibición de la NOS. Así, en nuestro laboratorio hemos demostrado recientemente que el tono basal de las arterias peneanas se encuentra regulado por la liberación basal, no solamente de NO, sino también de prostanoïdes relajantes derivados de las enzimas COX-1 y COX-2, encontrándose dicha liberación alterada en animales con Síndrome Metabólico (Sánchez et al., 2010).

En el presente estudio, la existencia de una alteración de la actividad basal del NO derivado del endotelio en las arterias de animales OZR está respaldada por la reducción de la vasodilatación producida por el inhibidor selectivo de la PDE-5, sildenafil, tanto en arterias peneanas como en coronarias (Figura 39). Se ha demostrado previamente que el sildenafil dilata arterias epicárdicas humanas y mejora la disfunción endotelial en pacientes con

enfermedad arterial coronaria (Halcox et al., 2002). Nuestros resultados muestran una respuesta relajante menor a sildenafil en las arterias peneanas de animales OZR (Figura 39C y D) lo que estaría de acuerdo con hallazgos en pacientes diabéticos que demuestran la incapacidad de este inhibidor de la PDE-5 para normalizar las respuestas dependientes del endotelio a la acetilcolina en las arterias peneanas de resistencia (Angulo et al., 2003). Estas observaciones fueron atribuidas inicialmente a la alteración de vías diferentes de la del NO que intervienen en las relajaciones dependientes del endotelio en el pene (Prieto et al., 1998) y que no se ve afectada por la inhibición de la PDE-5, como es la vía del EDHF. Sin embargo, en el presente estudio, se evaluó el efecto relajante directo del sildenafil, el cual se debe al aumento de la acumulación de GMP<sub>c</sub> y de este modo a la potenciación del efecto relajante del NO basal liberado del endotelio (Prieto et al., 2006; Sánchez et al., 2008). La participación del NO en las respuestas relajantes del sildenafil se confirma en el presente estudio por la marcada inhibición de dichas tras el bloqueo de la NOS tanto en las arterias peneanas como en las coronarias (Figura 39). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la vasodilatación dependiente de NO inducida por el sildenafil se encuentra reducida lo que reforzaría la existencia de una actividad basal de NO alterada en arterias de animales OZR, y en el caso de las arterias peneanas sería consistente con los datos clínicos que muestran una menor eficacia de los inhibidores orales de PDE-5 en el tratamiento de la disfunción eréctil en los pacientes diabéticos (Vickers y Wright, 2004).

### 3.3.1. Papel del NO en las respuestas relajantes dependientes del endotelio

Diversos estudios han evaluado las respuestas relajantes dependientes del endotelio en distintos lechos vasculares en humanos y en modelos animales de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, y la reducción de las respuestas mediadas por el NO ha sido previamente descrita en una gran variedad de estudios (Rizzoni et al., 2001; Frisbee y Stepp, 2001; Angulo et al., 2003; Bagi et al., 2003; Okon et al., 2005; Bouvet et al., 2007). En el presente estudio, se demuestra una alteración diferencial de la función endotelial en las arterias peneanas y coronarias de los animales OZR de la misma. Así, mientras que la actividad basal del NO parece estar igualmente deteriorada en los dos

lechos vasculares, la vasodilatación dependiente del endotelio inducida por agonistas (acetilcolina), estuvo considerablemente reducida en las arterias peneanas, pero preservada en las arterias coronarias de los mismos animales OZR (Figura 36). Nuestras observaciones en las arterias coronarias están de acuerdo con los datos de un estudio longitudinal reciente (Oltman et al., 2006) que demuestra que las respuestas vasodilatadoras de la acetilcolina en arterias coronarias de animales OZR no se ven afectadas hasta la edad de 24 semanas, pero disminuyen a las 28-36 semanas. Por el contrario, se ha demostrado previamente que las respuestas dilatadoras de la acetilcolina se encuentran alteradas en las arterias coronarias de ratones diabéticos tipo 2 (*db/db*) (Moien-Afshari et al., 2008). Estas diferencias en el grado de alteración de las respuestas relajantes a la acetilcolina de las arterias coronarias de OZR y de ratones *db/db* podrían ser atribuidas a los efectos nocivos de los niveles plasmáticos elevados de glucosa en la diabetes tipo 2 en comparación con la hiperglucemia leve presente en el estado prediabéticos de las ratas Zucker obesas. Por otro lado, las vasodilataciones inducidas por la acetilcolina estuvieron más afectadas en las arterias peneanas de los animales OZR que en el cuerpo cavernoso de ratones *db/db* (Luttrell et al., 2008), de acuerdo con lo demostrado previamente para las arterias peneanas humanas y el cuerpo cavernoso de los pacientes diabéticos (Angulo et al., 2003). El deterioro diferencial de la función endotelial en las arterias peneanas y del cuerpo cavernoso puede ser debido a la contribución diferente por parte de los diferentes factores endoteliales, como el NO, los prostanoides, y el EDHF, a la relajación del músculo liso arterial y trabecular del pene (Angulo et al., 2003; Prieto, 2008).

En el presente estudio, los experimentos con L-NOARG demuestran que la alteración de las respuestas vasodilatadoras a la acetilcolina en las arterias peneanas podría ser debida en parte a la alteración de las respuestas endoteliales mediadas por el NO ya que la inhibición selectiva de la NOS redujo en gran medida las relajaciones a la acetilcolina en ambos lechos vasculares. A diferencia de la acetilcolina, las relajaciones inducidas por el donante de NO, SNAP, se mantuvieron sin cambios tanto en las arterias peneanas como coronarias de los animales OZR en comparación con los controles, lo que indica que una menor sensibilidad del músculo liso vascular al NO, como se ha

demostrado en las arterias de pacientes diabéticos tipo 2 (Okon et al., 2005), parece poco probable en las arterias de OZR.

La disfunción endotelial basada en la deficiencia de NO se ha atribuido a varios mecanismos: la expresión/actividad reducida de la enzima eNOS, el desacoplamiento de la eNOS debido deficiencias en el sustrato o en los cofactores y al incremento en la inactivación –secuestro- del NO debido al aumento de la producción de aniones superóxido. Se ha demostrado que tanto la expresión de la proteína eNOS como su actividad pueden estar reducidos notablemente en las arterias coronarias y en las arteriolas del músculo esquelético de los animales OZR hiperinsulinémicos (Picchi et al., 2006; Eringa et al., 2007) y en las arterias de pacientes diabéticos tipo 2 (Okon et al., 2005). A diferencia de estos estudios, se ha descrito también una expresión de eNOS incrementada en las arterias cerebrales (Erdös et al., 2004) y en las coronarias (Katakam et al., 2005) de OZR, lo que fue atribuido a un mecanismo de compensación que acompaña a la mayor producción de aniones superóxido. En el presente estudio, no existieron cambios significativos en la expresión de eNOS total ni en las arterias peneanas ni coronarias de animales OZR en comparación con los LZR (Figura 40). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Fulton y col. (2004) quienes no encontraron cambios ni en la expresión de eNOS o ni en los niveles de ARN que codifica para la eNOS en el tejido vascular de tres diferentes modelos animales de resistencia a la insulina, junto con niveles de fosforilación de la eNOS en el residuo Ser1177 bien inalterados, o bien aumentados.

### 3.3.2. Influencia del estrés oxidativo sobre la función endotelial

Se considera el estrés oxidativo como un factor clave en la patogénesis de la disfunción vascular bajo condiciones de resistencia a la insulina y diabetes. Así, una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno ha sido asociada con la reducción de la biodisponibilidad de NO y la disfunción endotelial en las arterias cerebrales (Erdös et al., 2004), arterias coronarias (Bagi et al., 2003; Katakam et al., 2005; Picchi et al., 2006), y diferentes arterias periféricas (Frisbee et al., 2002; Bouvet et al., 2007) de animales OZR y animales con diabetes tipo 2. En las arterias coronarias de OZR, el nivel de estrés oxidativo aumentado altera la vasodilatación dependiente de insulina

pero no las respuestas vasodilatadoras a la acetilcolina dependientes del endotelio (Katakam et al., 2005), que se encuentran preservadas como se observa también en el presente estudio. Nuestros experimentos muestran que el tratamiento con SOD redujo parcialmente las respuestas contráctiles a la noradrenalina y serotonina en las arterias peneanas y coronarias de animales OZR, respectivamente, lo que sugiere que el aumento de la producción de aniones superóxido puede contribuir a la reducción de la biodisponibilidad de NO y al aumento de la vasoconstricción que se encuentra en las arterias de animales OZR (Figura 6A y B). Sin embargo, el tratamiento agudo con antioxidantes no normalizó completamente las respuestas contráctiles, ni restauró las relajaciones a la acetilcolina en las arterias peneanas de OZR (Figura 6C). Estos resultados sugieren que otros factores además del estrés oxidativo pueden contribuir a la disfunción endotelial de las arterias peneanas. Se requiere el estudio de los efectos a largo plazo del estrés oxidativo, así como del papel de los cambios postraslacionales de la eNOS y del metabolismo de los prostanoides y la endotelina, de poder determinar su posible implicación en la patogénesis de la disfunción endotelial peneana.

En este contexto, estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio demuestran una contribución diferente de los prostanoides a las vasodilataciones dependientes del endotelio de arterias coronarias y peneanas de animales sanos, lo que podría explicar la diferente alteración de dichas respuestas en animales con Síndrome Metabólico. Así, mientras que en las relajaciones a la acetilcolina participan, además del NO, prostaglandinas derivadas tanto de la COX-1 como de la COX-2 constitutiva en arterias peneanas de LZR, no parece existir una participación de las mismas en las relajaciones de las arterias coronarias. En animales con resistencia a la insulina, se encuentra alterado el metabolismo del ácido araquidónico tanto vía COX-1 como COX-2 contribuyendo a la disfunción endotelial de las arterias peneanas, lo que además podría explicar la falta de alteración significativa de las respuestas relajantes dependientes de acetilcolina en arterias coronarias (Sánchez et al., 2010).



#### 4. ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LAS ARTERIAS PENEANAS DURANTE EL SÍNDROME METABÓLICO

Los resultados del presente estudio demuestran la existencia de una vasoconstricción alterada en arterias de animales OZR debida en parte a la disminución de los efectos del NO liberado basalmente del endotelio vascular. En la última parte del estudio se evaluó si en la alteración de la respuesta arterial contráctil durante el Síndrome Metabólico podrían estar implicados, además, cambios en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  de las células musculares lisas. De forma específica, se investigaron los posibles cambios asociados a la vasoconstricción producida por activación selectiva del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico. Nuestros resultados demuestran que a pesar de no encontrarse diferencias significativas en la magnitud de la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina entre arterias de animales OZR con respecto a sus controles LZR, dicho agonista produjo contracciones mucho menos dependientes de la elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en OZR que en LZR, donde los incrementos de tensión inducidos por fenilefrina estuvieron acompañados de incrementos proporcionales de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figura 42C y 43C). Así, las relaciones  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tensión para el agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina estuvieron desplazadas significativamente hacia la izquierda, indicando una mayor contribución de los mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en la pared arterial de animales con Síndrome Metabólico.

Diversas investigaciones previas han abordado el estudio de las variaciones en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  y en las relaciones  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tensión para diferentes vasoconstrictores en arterias de modelos animales de diabetes y Síndrome Metabólico, habiéndose propuesto diferentes mecanismos responsables de los cambios en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, los estudios farmacológicos iniciales de Abebe y col. (1990a) encontraron que en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, la noradrenalina y la metoxamina provocaban incrementos mayores de tensión en aorta y arterias mesentéricas de animales diabéticos tipo 1 que en arterias de animales control, y que dicho incremento era debido fundamentalmente a la mayor movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares. Además, los mismos autores demostraron que la vasoconstricción aumentada a la noradrenalina se asociaba con un incremento de la entrada  $\text{Ca}^{2+}$  en parte por canales resistentes al bloqueo con

dihidropiridinas en la aorta de animales diabéticos tipo 1 frente a sus controles sanos (Abebe et al., 1994), si bien una actividad incrementada de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L también ha sido propuesta como causa de la vasoconstricción adrenérgica aumentada en arterias de animales diabéticos (Kamata et al., 1988; Ungvari et al., 1999). Estudios posteriores realizados en arterias humanas de pacientes con diabetes tipo 1 confirman una sensibilidad aumentada de las células de músculo liso arterial a los estímulos contráctiles, asociada con un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  perinuclear y debida tanto al incremento de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Esta contractilidad aumentada y asociada al incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]$  no fue, sin embargo, específica de receptor porque se demostró no solamente para la noradrenalina sino también para la estimulación con concentraciones altas de  $\text{K}^+$  extracelular (Fleischhacker et al., 1999).

Estas investigaciones en arterias y células de músculo liso vascular procedentes de pacientes diabéticos y de modelos animales de hiperglucemia, en los que se demuestra que la vasoconstricción aumentada se asocia con un mayor requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, difieren de los resultados del presente estudio que muestran una menor dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  de la contracción  $\alpha_1$ -adrenérgica y sugieren un incremento de la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de la maquinaria contráctil en respuesta a estímulos vasoconstrictores. Las diferencias podrían ser debidas a los diferentes modelos de vasculopatía diabética, ya que los animales OZR del presente estudio son hiperinsulinémicos pero muestran una hiperglucemia leve, a diferencia de los modelos de hiperglucemia en pacientes y animales con diabetes tipo 1. Nuestros resultados estarían de acuerdo, sin embargo, con los del estudio realizado por Naik y col. (2006) en el que emplearon ratas jóvenes y ratas adultas Zucker obesas, demostrando que mientras que las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la fenilefrina en arteriolas de músculo esquelético fueron similares en animales LZR y OZR de los dos grupos de edad, los incrementos de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  fueron significativamente menores en los animales OZR de ambos grupos. Sin embargo, tanto la despolarización con KPSS como con otro agonista, el análogo del  $\text{TXA}_2$  U46619, produjeron contracciones y una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  similar en todos los grupos de animales,

coincidiendo igualmente con nuestras observaciones de que ni el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  ni la contracción producidas por la despolarización con KPPS estuvieron aumentadas en arterias peneanas de OZR lo que indica que los cambios en la señalización de  $Ca^{2+}$  en las arterias de ratas OZR son selectivos para el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico.

En conjunto, estos resultados sugieren que en el Síndrome Metabólico, los mecanismos de vasoconstricción adrenérgica pueden ser mucho más dependientes de los cambios en la sensibilidad de las células musculares lisas al  $Ca^{2+}$ . Diversos factores podrían estar implicados en la sensibilidad aumentada al  $Ca^{2+}$  en arterias de animales OZR. Está bien establecido que la hiperglucemia conduce a una formación incrementada de diacilglicerol con la subsiguiente activación de diversas isoformas de la PKC en la pared vascular (Das Evcimen y King, 2007), y se ha demostrado que la PKC puede contribuir al incremento de la respuesta contráctil mediada por receptores acoplados a proteínas G en arterias de ratas con diabetes tipo 1 (Abebe y MacLeod, 1990b; Ungvari et al., 1999; Mueed et al., 2005) y en el cuerpo cavernoso de pacientes diabéticos (Angulo et al., 2006). La actividad incrementada de la PKC asociada a la activación del receptor  $\alpha$ -adrenérgico en arterias de ratas diabéticas estuvo acompañada de un incremento de la fosforilación del CPI-17 indicativo del aumento de los procesos de sensibilización al  $Ca^{2+}$  en la pared arterial (Mueed et al., 2005). Estudios realizados en ratones *ob/ob*, modelo de resistencia a la insulina/ diabetes tipo 2, demuestran sin embargo que la PKC no contribuye de manera significativa a la vasoconstricción  $\alpha_1$ -adrenérgica aumentada (Okon et al., 2003).

La vía de señalización intracelular asociada a RhoA/RhoK es activada por diversos agonistas que actúan sobre receptores acoplados a proteínas G y juega un papel esencial en múltiples funciones celulares entre las que se encuentran la reorganización del citoesqueleto, la contracción del músculo liso vascular, la agregación plaquetaria, la migración, la regulación de la expresión génica y la diferenciación celular (Somlyo y Somlyo, 2003). La demostración de que el inhibidor selectivo de la RhoK Y-27632 era capaz de disminuir la presión sanguínea en tres modelos de hipertensión (Uehata et al., 1997) proporcionó la primera evidencia de que podía existir un vínculo entre la RhoK y el desarrollo de enfermedad cardiovascular. Estudios recientes sugieren que la

sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por la RhoK puede contribuir a la vasoconstricción incrementada en la diabetes (Didion et al., 2005; Nishimatsu et al., 2005; Xie et al., 2006). Específicamente en lo que se refiere al tejido eréctil peneano, un incremento de la actividad de la vía RhoA/RhoK ha sido implicado en la función eréctil alterada de modelos animales tanto de diabetes tipo 1 (Bivalacqua et al., 2004a) como de Síndrome Metabólico (Wingard et al., 2009). Así, la inyección intracavernosa de un inhibidor de RhoK produjo una respuesta eréctil más potente -indicativa de una mayor actividad RhoK en ratas con diabetes 1 inducida por estreptozotocina (Bivalacqua et al., 2004a), y mejoró la respuesta eréctil a la estimulación de los nervios cavernosos en animales OZR (Wingard et al., 2009).

En el presente estudio, se evaluaron los mecanismos de esta actividad RhoK aumentada en las arterias peneanas de OZR, demostrándose que el efecto de la inhibición de RhoK sobre la tensión inducida por la fenilefrina fue significativamente mayor en los animales OZR comparados con los animales LZR (Figura 46 y 47). Teniendo en cuenta que dicho desarrollo de tensión fue mayoritariamente dependiente de la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 48), nuestros resultados sugieren que un mayor componente de la vasoconstricción arterial está mediado por RhoK en los animales OZR en comparación con los LZR. El incremento de la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RhoK en arterias de OZR se confirmó en experimentos en arterias despolarizadas con KPSS en las que se “fija” la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , y dónde mediante la adición acumulativa de Y-27632 se demostró una mayor potencia inhibidora y mayor efecto inhibidor máximo de este compuesto en arterias procedentes de animales OZR, confirmando también una mayor implicación de la enzima RhoK en los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 49). Considerando estos resultados de forma conjunta, se sugiere que existe un incremento en la vía intracelular asociada a RhoK en los animales OZR. De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos funcionales, la expresión total de RhoK-II en las arterias peneanas fue significativamente superior en dichos animales (Figura 51) lo que sugiere probablemente una actividad enzimática también aumentada, aunque son necesarios ensayos específicos para evaluarlo y determinar un incremento en la actividad basal y bajo la estimulación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico de la enzima RhoK. Nuestros

resultados estarían de acuerdo con los del estudio de Wingard y col. (2009) en los que el efecto beneficioso del inhibidor selectivo de RhoK Y-27263 sobre la función eréctil estuvo asociado con un incremento de la expresión tanto de la RhoA como de RhoK en el cuerpo cavernoso de OZR. Los datos en arterias peneanas coinciden además con los descritos en arteriolas musculares de animales OZR, en los que la inhibición de RhoK atenuó en mayor medida la vasoconstricción inducida por la fenilefrina, si bien los niveles de expresión de RhoA y RhoK fueron similares en LZR y OZR (Naik et al., 2006). Una mayor influencia de la vía de la RhoK en el tono vascular ha sido demostrada también en la microcirculación cerebral de ratones obesos *db/db*, modelo animal de diabetes tipo II, donde la respuesta vasodilatadora del Y-27632 estuvo incrementada comparada con los controles C57B1K (Didion et al., 2005).

Aunque la ruta de activación clásica para RhoK es a través de la proteína pequeña RhoA, diversas evidencias sugieren que RhoK puede ser activada por otros componentes, tales como el ácido araquidónico (Gong et al., 1995; Araki et al., 2001) o por esfingolípidos (Shirao et al., 2002). Además, la administración de fenilefrina incrementa la producción de ácido araquidónico en las células musculares lisas (Araki et al., 2001). Por otra parte, la inhibición de la MLCP por RhoK quizá sea mediada por la fosforilación directa por la propia quinasa (Feng et al., 1999) o indirecta a través del CPI-17 (Woodsome et al., 2001), el cuál actúa sobre la subunidad catalítica de la fosfatasa. Si estos componentes están involucrados o no y en qué medida en los mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la estimulación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico en las arterias peneanas de animales OZR será objeto de futuras investigaciones.

Se ha demostrado que el NO puede inducir vasodilatación en parte a través de la inhibición de la vía RhoA/RhoK y el control positivo de la expresión de la proteína RhoA (Sauzeau et al., 2003). Chitaley y Webb (2002) demostraron que el inhibidor de RhoK Y-27632 tenía un mayor efecto sobre la contracción inducida por la fenilefrina en arterias desprovistas de endotelio en comparación con arterias intactas, así como que la administración exógena de NO abolió el efecto incrementado del Y-27632 observado en las arterias sin endotelio. Debido a que las ratas OZR muestran disfunción endotelial y una disminución de la actividad basal de NO debida al incremento del estrés

oxidativo, es posible que la mayor inhibición producida por Y-27632 sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en los animales OZR sea debida en parte a la actuación de las especies reactivas de oxígeno sobre la pared arterial. Así, se ha demostrado también que el incremento del estrés oxidativo y de las especies reactivas de oxígeno, los cuales suelen tener un efecto contráctil *per se*, inducen la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por la RhoK (Jin et al., 2004). Por otra parte, el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia promueve la expresión del PAI-1 a través de la RhoK en células endoteliales humanas, lo que incrementa el riesgo de accidentes cardiovasculares en pacientes diabéticos (Rikitake y Liao, 2005).

Por otra parte, el presente trabajo demuestra en las arterias peneanas de animales sanos una implicación de RhoK en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a través de un canal de tipo ROC bajo la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico con fenilefrina. Nuestros resultados sugieren que la RhoK está inhibiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones altas de fenilefrina, ya que en presencia del inhibidor Y-27263 aumenta significativamente dicha entrada. Diversos mecanismos podrían explicar la falta de elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la menor dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  de la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en las ratas OZR. Una mayor actividad de la enzima RhoK, como se demuestra en arterias peneanas de los animales OZR, podría explicar la menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula muscular tras la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico. Por otra parte, podría estar alterada la cascada de señalización intracelular asociada al receptor, lo que se traduciría en un descenso en la despolarización celular y una alteración del potencial de membrana. No parece probable que la menor elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las células musculares lisas en respuesta a la estimulación con fenilefrina sea debida a una alteración en los canales VOC, ya que el estímulo clásico de estos canales al despolarizar la membrana con KPSS produjo una movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de magnitud similar en arterias de animales LZR y OZR.

Estudios previos han encontrado que la respuesta contráctil inducida por el KPSS puede estar disminuida (Head et al., 1987; Fulton et al., 1991; Kam et al., 1993; Wang et al., 1996), incrementada (White y Carrier, 1990; Fleischhacker et al., 1999), o no alterada en la diabetes (Mullhern y Docherty, 1989; Abebe y MacLeod, 1990) dependiendo del modelo animal empleado, del

lecho vascular y del grado progresión de la enfermedad. Se ha correlacionado una alteración de los canales VOC de tipo L y del metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  con la hiperglucemia y la hiperosmolaridad en el músculo liso vascular (Wang et al., 1998, 2000). Así, Wang y col. (2000) demostraron que las corrientes de tipo L en las células musculares lisas de animales diabéticos tipo 1 se veían significativamente reducidas durante la progresión de la diabetes, existiendo además un incremento en la sensibilidad de dichos canales a las dihidropiridinas. Se han demostrado también alteraciones en la reactividad vascular asociada a cambios en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales VOC de tipo L en otras enfermedades cardiovasculares como la hipercolesterolemia (Bowles et al., 2004), la aterosclerosis (Tiwari et al., 2006) y el Síndrome Metabólico (Borhouse et al., 2009), aunque con resultados aparentemente opuestos. Así, mientras que las corrientes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L estuvieron reducidas en miocitos arteriales coronarios de animales con hipercolesterolemia (Bowles et al., 2004), la vasoconstricción coronaria mediada por canales tipo L estuvo significativamente aumentada en un modelo porcino de Síndrome Metabólico (Borhouse et al., 2009).

Alternativamente a los posibles cambios en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales VOC tipo L, las alteraciones en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  observadas en la vasoconstricción peneana  $\alpha_1$ -adrenérgica en animales con Síndrome Metabólico quizás impliquen cambios en la organización de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, en la expresión de sus receptores y transportadores, y en las vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no operada por voltaje como las mediadas por SOC y ROC, lo que se traduciría en una menor  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico. En este contexto, Curtis y col. (2003) ha demostrado que mientras que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L permaneció inalterada, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa estuvo reducida en arteriolas retinianas de ratas diabéticas tipo I. Otros factores adicionales podrían estar relacionados con un metabolismo anormal del  $\text{Ca}^{2+}$  en la diabetes (Levy et al., 1994; Balasubramanyam et al., 2001) como por ejemplo, la inactivación de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (Levy et al., 1994), los canales de  $\text{K}^+$  (Dimitriloulou et al., 2002; Liu y Gutterman, 2002) o la modulación de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana (Algenstaedt et al., 1997; Berra-Romani et al., 2008). Se ha demostrado la expresión a la alta y la actividad aumentada de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo

sarcoplásmico en la diabetes y dislipemia, lo que produciría un incremento en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al interior del retículo sarcoplásmico contribuyendo así al descenso citosólico del  $\text{Ca}^{2+}$  (Hill et al., 2003). Se requieren investigaciones adicionales con el fin de poder determinar de forma más específica si variaciones en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales VOC, ROC y/o SOC podrían contribuir a la menor dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  de la vasoconstricción adrenérgica en animales OZR.

El papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la función de la célula de músculo liso vascular no se limita al control de la contractilidad y del tono vascular, sino que este ión es también esencial en la activación de los procesos de transcripción asociados con el crecimiento y proliferación celular (Cartin et al., 2000; Wamhoff et al., 2006), lo que conlleva un control exquisito de la entrada localizada de  $\text{Ca}^{2+}$  y su liberación cerca del sarcolema y del núcleo. Esto implica que la localización espacial de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  es crítica en la regulación de los cambios regionales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y que los procesos de remodelado asociados con proliferación de las células musculares lisas en el curso de la diabetes probablemente alteren las respuestas regionales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El mantenimiento de concentraciones suficientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma y en el retículo sarcoplásmico se requiere tanto para el crecimiento como para la proliferación celular (Short et al., 1993; Berridge et al., 1995; Golovina et al., 2001). Aunque la contribución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales VOC tipo L es crítica en la regulación de la contracción en el músculo liso, se ha descrito que su participación se encuentra significativamente disminuida en las células no diferenciadas o durante la propia proliferación celular (Quignard et al., 2001). Por el contrario, los estudios iniciales de Yoo y col. (1997) en miocitos aórticos en cultivo procedentes de ratas espontáneamente diabéticas Goto-Kakizaki, han descrito una entrada incrementada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través tanto de canales VOC como de ROC. La modulación que sufren los miocitos desde el estado contráctil a uno proliferativo resulta importante en el desarrollo vascular y también contribuye a enfermedades como la hipertensión, aterosclerosis y reestenosis posterior a la angioplastia (Ross, 1993; Hao et al., 2003). Recientemente, Berra-Romani y col. (2008) han estudiado las alteraciones del metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  que suceden durante la progresión de los miocitos arteriales desde un estado contráctil a uno proliferativo en cultivo, encontrando



cambios significativos en el almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico (incremento en la expresión de los  $\text{InsP}_3\text{R}$  y  $\text{SERCA2b}$ ), la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales SOC (incremento en el vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a ácido ciclopiazónico e incremento de la expresión de las proteínas  $\text{TRPC1/4/5}$   $\text{STIM1}$  y  $\text{Orai}$ ) y canales ROC (atribuida a la regulación a la alta de las proteínas  $\text{TRPC3/6}$ ).

Los resultados de la última parte del presente trabajo indican que en este modelo animal de Síndrome Metabólico, la vasoconstricción peneana  $\alpha_1$ -adrenérgica, que es esencial en el mantenimiento del estado de flacidez, se relaciona con una menor dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  y un incremento en la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por  $\text{RhoK}$ . Debido a que en las arterias de los animales OZR se demuestra además la presencia de un remodelado vascular, es posible que los cambios en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  tengan como finalidad desviar dicho ión de los procesos contráctiles a compartimentos celulares relacionados con los procesos de crecimiento y proliferación de la pared vascular.

En resumen, la disfunción eréctil presenta una alta incidencia en pacientes diabéticos en los que la disfunción endotelial y la disponibilidad reducida de NO probablemente están relacionados con la menor respuesta de estos pacientes a los inhibidores orales de la PDE-5 (Vickers y Wright, 2004; Vardi, 2009). Estos compuestos amplifican los efectos del NO endotelial en las arterias peneanas (Prieto et al., 2006; Sánchez et al., 2008). Los resultados del presente estudio confirman que la liberación basal de NO y la respuesta vasodilatadora al sildenafil se encuentran alteradas en las arterias peneanas de la rata Zucker obesa, modelo animal de Síndrome Metabólico o prediabetes. Por otro lado, se demuestra que los inhibidores de la  $\text{RhoK}$  pueden reducir tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  como los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  que subyacen a la vasoconstricción arterial peneana. Si bien los procesos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran reducidos en favor de los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en las arterias de animales con Síndrome Metabólico, la mayor expresión de  $\text{RhoK}$  juega un papel esencial en la vasoconstricción, por lo que los antagonistas de la vía de señalización de la  $\text{RhoA/RhoK}$  se perfilan como una diana terapéutica alternativa en la disfunción eréctil.

## **VI. CONCLUSIONES**



En el presente estudio se han investigado los mecanismos de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  de la vasoconstricción arterial peneana y sus posibles alteraciones en la pared arterial de un modelo animal de Síndrome Metabólico.

**De los resultados obtenidos podemos concluir:**

1. La vasoconstricción arterial peneana producida tanto por la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico como del receptor TP está acoplada a una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a través de canales VOC tipo L y de canales ROC, con una escasa participación del  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares.
2. La quinasa Rho participa en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un canal ROC bajo la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, pero no en el caso del receptor TP.
3. El vaciamiento pasivo de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  revela una entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  no acoplada a la contracción ni regulada por Rho quinasa en arterias peneanas.
4. En la vasoconstricción  $\alpha_1$ -adrenérgica de las arterias peneanas participan mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por Rho quinasa, proteína quinasa C y tirosina quinasa.
5. La sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  activada por el receptor TP en el tejido eréctil está mediada por la fosforilación de la subunidad reguladora de la fosfatasa (MYPT) a través de la enzima Rho quinasa.
6. En las ratas Zucker obesas, las arterias peneanas poseen una marcada disfunción endotelial que se correlaciona con un remodelado vascular, mientras que en las arterias coronarias la estructura está preservada aunque existe una disfunción endotelial incipiente puesta de manifiesto por la alteración de la liberación basal de NO.
7. En las arterias peneanas como en las arterias coronarias de animales con Síndrome Metabólico existe una vasoconstricción aumentada, lo que se

debe en parte a la alteración de la liberación basal de NO endotelial por la influencia del estrés oxidativo.

8. Las arterias peneanas de ratas Zucker obesas muestran un descenso de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  asociada a la vasoconstricción  $\alpha_1$ -adrenérgica a favor de procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por Rho quinasa.

### **Conclusión final:**

Del conjunto de resultados obtenidos podemos concluir que en condiciones de riesgo cardiovascular, se producen cambios importantes en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  en el tejido arterial peneano, con un incremento de los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  implicados en la vasoconstricción a expensas de la reducción del flujo de este ión, probablemente desviado hacia procesos de crecimiento y proliferación de la pared arterial. El papel esencial de la quinasa Rho en este cambio sitúa a los inhibidores de la enzima como interesantes alternativas terapéuticas en el tratamiento de la disfunción eréctil. Por otro lado, los cambios estructurales y funcionales que se producen en las arterias peneanas durante el Síndrome Metabólico preceden a la alteración funcional del lecho vascular coronario, lo que refuerza el concepto clínico actual que considera la disfunción eréctil como una manifestación temprana de disfunción endotelial y de enfermedad cardiovascular, y sugiere que la disfunción eréctil podría constituir un indicador diagnóstico preciso de patologías vasculares más severas.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abebe W, Harris K, MacLeod K. (1990a) Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to 1-adrenoceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16:239-248.
- Abebe W, Harris K, MacLeod K. (1990b). Protein kinase C-mediated contractile responses of arteries from diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 101:465-471.
- Abebe W, Harris K, MacLeod K. (1994) Role of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the selective enhancement of contractile responses of arteries from diabetic rats to noradrenaline. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72:1544-1551.
- Aboseif SR, Lue TF. (1988) Hemodynamics of penile erection. *Urol. Clin.* 15:1-7.
- Akaike N, Kanaide H, Kuga T, Nakamura M, Sadoshima J, Tomoike H. (1989) Low voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J. Physiol.* 416:141-160.
- Albert AP, Large WA. (2003) Synergism between inositol phosphates and diacylglycerol on native TRPC6-like channels in rabbit portal vein myocytes. *J. Physiol.* 552:789-795.
- Albert AP, Large WA. (2006) Signal transduction pathways and gating mechanisms of native TRP-like cation channels in vascular myocytes (Review). *J. Physiol.* 570:45-51.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357:593-615.
- Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. (2008) Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp. Physiol.* 93:528-537.
- Algenstaedt P, Antonetti DA, Yaffe MB, Kahn CR. (1997) Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in muscle and heart. *J. Biol. Chem.* 272:23696-23702.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:7915-7922.
- Andersson KE, Wagner G. (1995) Physiology of penile erection. *Physiol. Rev.* 75:191-236.
- Andersson KE. (2001) Neurophysiology/pharmacology of erection. *Int. J. Impot. Res.* 3:S8-S17.
- Andersson KE. (2001) Pharmacology of Penile Erection. *Pharmacol. Rev.* 53:417-450.
- Angelotti T, Hofmann F. (1996) Tissue-specific expression of splice variants of the mouse voltage-gated calcium channel  $\alpha_2/\delta$  subunit. *FEBS Lett.* 397:331-337.
- Angulo J, Cuevas P, Fernández A, Allona A, Moncada I, Martín-Morales A, La Fuente JM, de Tejada IS. (2006) Enhanced thromboxane receptor-mediated responses and impaired endothelium-dependent relaxation in human corpus cavernosum from diabetic impotent men: role of protein kinase C activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319:783-789.
- Angulo J, Cuevas P, Fernández A, Gabancho S, Allona A, Martín-Morales A, Moncada I, Videla S, Sáenz de Tejada I. (2003) Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312:1202-1208.
- Angulo J, Cuevas P, Fernández A, Gabancho S, Videla S, Sáenz de Tejada I. (2003) Calcium dobesilate potentiates endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation of human penile resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.* 139:854-862.
- Angulo J, Cuevas P, La Fuente JM, Pomerol JM, Ruiz-Castañé E, Puigvert A, Gabancho S, Fernández A, Ney P, Sáenz De Tejada I. (2002) Regulation of human penile smooth muscle tone by prostanoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 136:23-30.



- Araki S, Ito M, Kureishi Y, Feng J, Machida H, Isaka N, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T. (2001) Arachidonic acid-induced  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase. *Pflügers Arch.* 441:596-603.
- Araujo A, Travison T, Ganz P, Chiu G, Kupelian V, Rosen R, Hall S, McKinlay J. (2009) Erectile Dysfunction and Mortality. *J. Sex. Med.* 6:2445-2454.
- Azadzi KM, Master TA, Siroky MB. (2004) Effect of chronic ischemia on constitutive and inducible nitric oxide synthase expression in erectile tissue. *J. Androl.* 25:382-388.
- Bagi Z, Koller A, Kaley G. (2003) Superoxide-NO interaction decreases flow and agonist-induced dilations of coronary arterioles in Type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H1404-H1410.
- Bakircioglu ME, Hsu K, El-Sakka A, Sievert KD, Lin CS, Lue TF. (2000) Effect of a Chinese herbal medicine mixture on a rat model of hypercholesterolemic erectile dysfunction. *J. Urol.* 164:1798-17801.
- Bakircioglu ME, Sievert KD, Nunes L, Lau A, Lin CS, Lue TF. (2001) Decreased trabecular smooth muscle and caveolin-1 expression in the penile tissue of aged rats. *J. Urol.* 166:734-738.
- Balasubramanyam M, Balaji RA, Subashini B, Mohan V. (2001) Evidence for mechanistic alterations of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Exp. Diab. Res.* 1:275-287.
- Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A. (1998) Shear stress and the endothelium. *Kidney Int.* 67:S100-S108.
- Barnard EA, Burnstock G, Webb TE. (1994) G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 15:67-70.
- Basora N, Boulay G, Bilodeau L, Rousseau E, Payet MD. (2003) O-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* 278:31709-31716.
- Batenburg WW, Garredts IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, Danser AH. (2004) Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation.* 109:2296-2301.
- Báthori G, Csordás G, Garcia-Perez C, Davies E, Hajnóczy G. (2006)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *J. Biol. Chem.* 281:17347-17358.
- Batra AK, Lue TF. (1991) Penile erection: Circulatory physiology. Impotence: Diagnosis and management of male erectile dysfunction. Eds. Kirby, R. S., Carson, C. y Webster Oxford, G. D. Butterworth-Heinemann, U. K., pp.: 19-26.
- Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H, Sessa WC. (2003) Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 278:14841-14849.
- Becker AJ, Ückert S, Stief CG, Scheller F, Knapp WH, Hartmann U, Jonas U. (2001) Plasma levels of angiotensin II during different penile conditions in the cavernous and systemic blood of healthy men and patients with erectile dysfunction. *Urology.* 58:805-810.
- Becker AJ, Ückert S, Stief CG, Truss MC, Machtens S, Scheller F, Knapp WH, Hartmann U, Jonas U. (2000) Plasma levels of cavernous and systemic norepinephrine and epinephrine in men during different phases of penile erection. *J. Urol.* 164:573-577.
- Becker AJ, Ückert S, Stief CG, Truss MC, Machtens S, Scheller F, Knapp WH, Hartmann U, Jonas U. (2001) Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection

- and detumescence. *Urology*. 57:193-198. Becker AJ, Uckert S, Stief CG, Truss MC, Hartman U, Sohn M, Jonas U. (2000) Systemic and cavernous plasma levels of endothelin 1 in healthy males during different functional conditions of the penis. *World J. Urol.* 18:227-231.
- Becker GL, Fiskum G, Lehninger AL. (1980) Regulation of free  $\text{Ca}^{2+}$  by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 255:9009-9012.
- Behrendt D, Ganz P. (2002) Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am. J. Cardiol.* 90:40L-48L.
- Belardetti F, Zamponi GW. (2008) Linking calcium-channel isoforms to potential therapies. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 9:707-715.
- Benham CD, Hess P, Tsien RW. (1987) Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Circ. Res.* 61:110-116.
- Benham CD, Tsien RW. (1987) A novel receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature*. 328:275-278.
- Bergdahl A, Gomez MF, Dreja K, Xu SZ, Adner M, Beech DJ, Broman J, Hellstrand P, Sward K. (2003) Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry dependent on TRPC1. *Circ. Res.* 93:839-847.
- Bergdahl A, Gomez MF, Wihlborg AK, Erlinge D, Eyjolfson A, Xu SZ, Beech DJ, Dreja K, Hellstrand P. (2005) Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: correlation with store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288:C872-C880.
- Berra-Romani R, Mazzocco-Spezia A, Pulina MV, Golovina VA. (2008)  $\text{Ca}^{2+}$  handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295:C779-C790.
- Berridge MJ. (1993) Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature*. 361:315-325.
- Berridge MJ. (1995) Calcium signaling and cell proliferation. *Bioessays*. 17:491-500.
- Berridge MJ. (2008) Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J. Physiol.* 586:5047-5061.
- Bezprozvanny I, Ehrlich BE. (1993) ATP modulates the function of Inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels at two sites. *Neuron*. 10:1175-1184.
- Bielefeldt K. (1999) Molecular diversity of voltage-sensitive calcium channels in smooth muscle cells. *J. Lab. Clin. Med.* 133:469-477.
- Billups KL, Bank AJ, Padma-Nathan H, Katz S, Williams R. (2005) Erectile dysfunction is a marker for cardiovascular disease: results of the minority health institute expert advisory panel. *J. Sex. Med.* 2:40-50.
- Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T. (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 13:505-506.
- Bishop AL, Hall A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 2:241-255.
- Bitar KN, Bradford PG, Putney JW, Makhlof GM. (1986) Stoichiometry of contraction and  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization by inositol 1,4,5-trisphosphate in isolated gastric smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 261:16591-16596.
- Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, Celtek S, Chitale K, Webb RC, Lewis RL, Mills TM, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ. (2004a) RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:9121-9126.

- Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Leungwattanakij S, Dabisch PA, McNamara DB, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. (2004b) Effect of combination endothelial nitric oxide synthase gene therapy and sildenafil on erectile function in diabetic rats. *Int. J. Impot. Res.* 16:21-29.
- Bivalacqua TJ, Usta MF, Kendirci M, Pradhan L, Alvarez X, Champion HC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJG. (2005) Superoxide anion production in the rat penis impairs erectile function in diabetes: influence of in vivo extracellular superoxide dismutase gene therapy. *J. Sex. Med.* 2:187-198.
- Bogdan C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2:907-916.
- Bolton TB, Prestwich SA, Zholos AV, Gordienko DV. (1999) Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu. Rev. Physiol.* 61:85-115.
- Bolton TB. (1979) Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59:606-718.
- Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM. (1997) Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endotheliumdependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:2333-2340.
- Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, Jo H. (2002) Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser 635 by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283:H1819-H1828.
- Borbouse L, Dick GM, Asano S, Bender SB, Dincer UD, Payne GA, Neeb ZP, Bratz IN, Sturek M, Tune JD. (2009) Impaired function of coronary BK(Ca) channels in metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297:H1629-H1637.
- Boulanger CM, Nakashima M, Olmos L, Joly G, Vanhoutte PM. (1994) Effects of the  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist RO 40-5967 on endothelium-dependent responses of isolated arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23:869-876.
- Bouvet C, Belin de CE, Guihot AL, Vessieres E, Bocquet A, Dumont O, Jardel A, Loufrani L, Moreau P, Henrion D. (2007) Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension.* 50:248-254.
- Bowles DK, Heaps CL, Turk JR, Maddali KK, Price EM. (2004) Hypercholesterolemia inhibits L-type calcium current in coronary macro-, not microcirculation. *J. Appl. Physiol.* 96:2240-2248.
- Bredt DS, Snyder SH. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:682-685.
- Briones AM, Rodríguez-Criado N, Hernanz R, García-Redondo AB, Rodrigues-Díez RR, Alonso MJ, Egidio J, Ruiz-Ortega M, Salices M. (2009) Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension.* 54:142-149.
- Broad LM, Cannon TR, Taylor CW. (1999) A non-capacitative pathway activated by arachidonic acid is the major  $\text{Ca}^{2+}$  entry mechanism in rat A7r5 smooth muscle cells stimulated with low concentrations of vasopressin. *J. Physiol.* 517:121-134.
- Broderick GA. (1998) Evidence based assessment of erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 10:S64-S73.
- Broderick GA. (2003) Oral pharmacotherapy and the contemporary evaluation and management of erectile dysfunction. *Rev. Urol.* 5:S9-S20.
- Brozovich FV. (2002) Myosin light chain phosphatase: it gets around. *Circ. Res.* 90:500-502.
- Brozovich FV. (2003) Rho signaling: agonist stimulation and depolarization come together. *Circ. Res.* 93:481-483.

- Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC. (2000) In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat. Med.* 6:1362-1367.
- Budzyn K, Paull M, Marley PD, Sobey CG. (2006) Segmental differences in the roles of rho-kinase and protein kinase C in mediating vasoconstriction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317:791-796.
- Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS, Chang TS, Snyder SH. (1992) Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science.* 257:401-403.
- Burnett AL. (1995) Nitric oxide control of lower genitourinary tract functions: a review. *Urology.* 45:1071-1083.
- Burnett AL. (1998) *The Handbook of Sexual Dysfunction.* San Francisco: Am. Soc. Androl. pp. 12-17.
- Burnett AL. (2004) Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. *Int. J. Impot. Res.* 1:S15-S19.
- Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci.* 23:374-380.
- Busse R, Mülsch M. (1990) Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett.* 265:133-136.
- Byron K, Taylor CW. (1995) Vasopressin stimulation of  $Ca^{2+}$  mobilization, two bivalent cation entry pathways and  $Ca^{2+}$  efflux in A7r5 rat smooth muscle cells. *J. Physiol.* 485:455-468.
- Campbell WB, Falck JR. (2007) Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension.* 49:590-596.
- Carneiro FS, Giachini FR, Lima VV, Carneiro ZN, Leite R, Inscho EW, Tostes RC, Webb RC. (2008) Adenosine actions are preserved in corpus cavernosum from obese and type II diabetic db/db mouse. *J. Sex. Med.* 5:1156-1166.
- Carson CC, Burnett AL, Levine LA, Nehra A. (2002) The efficacy of sildenafil citrate (Viagra) in clinical populations: an update. *Urology.* 60:12-27.
- Cartin L, Lounsbury KM, Nelson MT. (2000) Coupling of  $Ca^{2+}$  to CREB activation and gene expression in intact cerebral arteries from mouse: roles of ryanodine receptors and voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels. *Circ. Res.* 86:760-767.
- Cartledge J, Minhas S, Eardley I. (2001) The role of nitric oxide in penile erection. *Expert. Opin. Pharmacother.* 2:95-107.
- Casteels R, Droogmans G. (1981) Exchange characteristics of the noradrenalinesensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *J. Physiol.* 317:263-279.
- Cellek S, Moncada S. (1997) Nitric oxide control of peripheral sympathetic responses in the human corpus cavernosum: a comparison with other species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:8226-8231.
- Chang S, Hypolite JA, Velez M, Changolkar A, Wein AJ, Chacko S, DiSanto ME. (2004) Downregulation of cGMP-dependent protein kinase-1 activity in the corpus cavernosum smooth muscle of diabetic rabbits. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287:R950-R960.
- Chavakis E, Dernbach E, Hermann C, Mondorf UF, Zeiher AM, Dörmeling S. (2001) Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Circulation.* 104:2102-2107.

- Chew KK, Bremner A, Jamrozik K, Earle C, Stuckey B. (2008) Male erectile dysfunction and cardiovascular disease: is there an intimate nexus? *J. Sex. Med.* 5:928-934.
- Chitaley K, Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, Hellstrom WJ, Mills TM, Webb RC. (2002) Adeno-associated viral gene transfer of dominant negative RhoA enhances erectile function in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298:427-432.
- Chitaley K, Webb RC. (2002) Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of Rho-kinase signaling. *Hypertension.* 39:438-442.
- Chitaley K, Wingard CJ, Webb RC, Branam H, Stopper VS, Lewis RW, Mills TM. (2001) Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nature Med.* 7:119-122.
- Clapham DE. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 426:517-524.
- Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Tamargo J, Pérez-Vizcaino F. (2003) Thromboxane A<sub>2</sub>-induced inhibition of voltage-gated K<sup>+</sup> channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase C $\zeta$ . *Circ. Res.* 93:656-663.
- Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Tamargo J, Pérez-Vizcaino F. (2005) Postnatal shift from PKC and voltage-gated K<sup>+</sup> channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc. Res.* 66:84-93.
- Collier ML, Ji G, Wang Y, Kotlikoff MI. (2000) Calcium-induced calcium release in smooth muscle: loose coupling between the action potential and calcium release. *J. Gen. Physiol.* 115:653-662.
- Collin T, Lory P, Taviaux S, Courtieu C, Guilbault P, Berta P, Nargeot J. (1994) Cloning chromosomal location and functional expression of the human voltage-dependent calcium-channel 3 subunit. *Eur. J. Biochem.* 220:257-262.
- Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. (2004) TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature.* 432:723-730.
- Coussin F, Macrez N, Morel JL, Mironneau J. (2000) Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in vascular myocytes. *J. Biol. Chem.* 275:9596-9603.
- Csordas G, Madesh M, Antonsson B, Hajnoczky G. (2002) tcBid promotes Ca<sup>2+</sup> signal propagation to the mitochondria: control of Ca<sup>2+</sup> permeation through the outer mitochondrial membrane. *EMBO J.* 21:2198-2206.
- Csordas G, Renken C, Varnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajnoczky G. (2006) Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* 174:915-921.
- Curtis TM, Major EH, Trimble ER, Scholfield CN. (2003) Diabetes-induced activation of protein kinase C inhibits store-operated Ca<sup>2+</sup> uptake in rat retinal microvascular smooth muscle. *Diabetologia.* 46:1252-1259.
- da Costa Gonçalves AC, Leite R, Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Reis AB, Reis FM, Touyz RM, Webb RC, Alenina N, Bader M, Santos RA. (2007) Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an important role in erectile function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293:H2588-H2596.

- Dai JM, Kuo KH, Leo JM, van Breemen C, Lee CH. (2006) Mechanism of ACh-induced asynchronous calcium waves and tonic contraction in porcine tracheal muscle bundle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290:L459-L469.
- Dail WG. (1993) Autonomic innervation of male reproductive genitalia; in Maggi CA (ed): *Nervous Control of the Urogenital System*. Chur. Harwood Academic Publishers.
- Das Evcimen N, King GL. (2007) The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol. Res.* 55:498-510.
- De Groat WC, Booth AM. (1993) Neural control of penile erection, in *The Autonomic Nervous System, Nervous Control of the Urogenital System*. Harwood Academic Publishers. 6:465-513.
- De Smedt F, Missiaen L, Parys JB, Vanweyenbergh V, De Smedt H, Erneux C. (1997) Isoprenylated human brain type I inositol 1,4,5- trisphosphate 5-phosphatase controls  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations induced by ATP in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 272:17367-17375.
- De Toledo FG, Cheng J, Liang M, Chini EN, and Dousa TP. (2000) ADPribosyl cyclase in rat vascular smooth muscle cells: properties and regulation. *Circ. Res.* 86:1153-1159.
- De Young L, Yu D, Bateman RM, Brock GB. (2004) Oxidative stress and antioxidant therapy: their impact in diabetes-associated erectile dysfunction. *J. Androl.* 25:830-836.
- Del Valle-Rodríguez A, Calderón E, Ruiz M, Ordoñez A, López-Barneo J, Ureña J. (2006) Metabotropic  $\text{Ca}^{2+}$  channel-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release and ATP-dependent facilitation of arterial myocyte contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:4316-4321.
- Dessy C, Kim I, Sougnéz CL, Laporte R, Morgan KG. (1998) A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 275:C1081-C1086.
- Didion SP, Lynch CM, Baumbach GL, Faraci FM. (2005) Impaired endothelium-dependent responses and enhanced influence of Rho-kinase in cerebral arterioles in type II diabetes. *Stroke.* 36:342-347.
- Dietrich A, Chubanov V, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T. (2006) Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacol. Ther.* 112:744-760.
- Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Kalwa H, Storch U, Gudermann T. (2005a) Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 371:257-265.
- Dimitroloulou C, Han G, Miller A, Molero M, Fuchs L, White RE, Varrier GO. (2002) Potassium (BKCa) currents are reduced in microvascular smooth muscle cells from insulin-resistant rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282:H908-H917.
- Ding X, Murray PA. (2005) Cellular mechanisms of thromboxane A<sub>2</sub>-mediated contraction in pulmonary veins. *Am. J. Physiol.* 289:L825-L833.
- Dorrance AM, Lewis RW, Mills TM. (2002) Captopril treatment reverses erectile dysfunction in male stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Int. J. Impot. Res.* 14:494-497.
- Dousa T, Chini E, Beers K. (1996) Adenine nucleotide diphosphates: emerging second messengers acting via intracellular Ca release. *Am. J. Physiol.* 271:C1007-C1024.
- Dufour JF, Arias IM, Turner TJ. (1997) Inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium regulate the calcium channel function of the hepatic inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 272:2675-2681.

- Dziadek MA, Johnstone LS. (2007) Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. *Cell Calcium*. 42:123-132.
- Earley S. (2006) Molecular diversity of receptor operated channels in vascular smooth muscle: a role for heteromultimeric TRP channels? *Circ. Res.* 98:1462-1464.
- Endemann DH, Schiffrin EL. (2004) Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:1983-1992.
- Erdős B, Snipes JA, Miller AW, Busija DW. (2004) Cerebrovascular dysfunction in Zucker obese rats is mediated by oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes*. 53:1352-1359.
- Eringa EC, Stehouwer CD, Roos MH, Westerhof N, Sipkema P. (2007) Selective resistance to vasoactive effects of insulin in muscle resistance arteries of obese Zucker (fa/fa) rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293:E1134-E1139.
- Escrig A, Marin R, Abreu P, Gonzalez-Mora JL, Mas M. (2002) Changes in mating behavior, erectile function, and nitric oxide levels in penile corpora cavernosa in streptozotocin-diabetic rats. *Biol. Reprod.* 66:185-189.
- Eskin SG, Turner NA, McIntire LV. (2004) Endothelial cell cytochrome P450 1A1 and 1B1: up-regulation by shear stress. *Endothelium*. 11:1-10.
- Esposito K, Giugliano F, Martedì E, Feola G, Marfella R, D'Armiento M, Giugliano D. (2005) High proportions of erectile dysfunction in men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 28:1201-1203.
- Essin K, Welling A, Hofmann F, Luft FC, Gollasch M, Moosmang S. (2007) Indirect coupling between Cav1.2 channels and ryanodine receptors to generate  $\text{Ca}^{2+}$  sparks in murine arterial smooth muscle cells. *J. Physiol.* 584:205-219.
- Eto M, Kitazawa T, Yazawa M, Mukai H, Ono Y, Brautigan DL. (2001) Histamine-induced vasoconstriction involves phosphorylation of a specific inhibitor protein for myosin phosphatase by protein kinase C and isoforms. *J. Biol. Chem.* 273:29072-29078.
- Evans AM, Dipp M. (2002) Hypoxic pulmonary vasoconstriction: cyclic adenosine diphosphate-ribose, smooth muscle  $\text{Ca}^{2+}$  stores and the endothelium. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 132:3-15.
- Facemire CS, Arendshorst WJ. (2005) Calmodulin mediates norepinephrine induced receptor-operated calcium entry in preglomerular resistance arteries. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289:F127-F136.
- Facemire CS, Mohler PJ, Arendshorst WJ. (2004) Expression and relative abundance of short transient receptor potential channels in the rat renal microcirculation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286:F546-F551.
- Fahrenkrug J. (1993) Transmitter role of vasoactive intestinal peptide. *Pharmacol. Toxicol.* 72:354-363.
- Fantozzi I, Zhang S, Platoshyn O, Remillard CV, Cowling RT, Yuan JX. (2003) Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285:L1233-L1245.
- Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA, Phillips SC. (2000) Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:3702-3707.
- Fazio L, Brock G. (2004) Erectile dysfunction: management update. *CMAJ.* 9:1429-1437.
- Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. (1994) Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J. Urol.* 151:54-61.

- Fellner SK, Arendshorst WJ. (2002) Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is exaggerated in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells of SHR. *Kidney Int.* 61:2132-2141.
- Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, Nakano T. (1999) Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J. Biol. Chem.* 274:37385-37390.
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271:22810-22814.
- Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T. (1998) The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J. Biol. Chem.* 273:3125-3128.
- Ferrara N, Abete P, Ambrosio G, Landino P, Caccese P, Cirillo P, Oradei A, Littarru GP, Chiariello M, Rengo F. (1995) Protective role of chronic ubiquinone administration on acute Cardiac oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Therapy.* 274:858-865.
- Ferrini MG, Kovanecz I, Sanchez S, Vernet D, Davila HH, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. (2007) Long-term continuous treatment with sildenafil ameliorates aging-related erectile dysfunction and the underlying corporal fibrosis in the rat. *Biol Reprod.* 76:915-923.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.* 441:179-185.
- Figueroa XF, Chen CC, Campbell KP, Damon DN, Day KH, Ramos S, Duling BR. (2007) Are voltage-dependent ion channels involved in the endothelial cell control of vasomotor tone? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293:H1371-H1383.
- Finch EA, Turner TJ, Goldin SM. (1991) Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science.* 252:443-446.
- Firth AL, Remillard CV, Yuan JX. (2007) TRP channels in hypertension. *Biochim. Biophys. Acta* 1772:895-906.
- Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. (1999) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature.* 401:493-497.
- Fleischhacker E, Esenabhalu VE, Spitaler M, Holzmann S, Skrabal F, Koidl K, Kostner GM, Graier WF. (1999) Human diabetes is associated with hyperreactivity of vascular smooth muscle cell. *Diabetes.* 48:1323-1330.
- Fleming I, Busse R. (1999) Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc. Res.* 43:532-541.
- Fleming I, Busse R. (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284:R1-R12.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. (2001) Phosphorylation of Thr(495) regulates  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ. Res* 88:E68-E75.
- Fleming I, Mohamed A, Galle J, Turchanowa L, Brandes RP, Fisslthaler B, Busse R. (2005) Oxidized low-density lipoprotein increases superoxide production by endothelial nitric oxide synthase by inhibiting PKC $\alpha$ . *Cardiovasc. Res.* 1:897-906.
- Flemming R, Cheong A, Dedman AM, Beech DJ. (2002) Discrete store operated calcium influx into an intracellular compartment in rabbit arteriolar smooth muscle. *J. Physiol.* 543:455-464.
- Flemming R, Xu SZ, Beech DJ. (2003) Pharmacological profile of store operated channels in cerebral arteriolar smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 139:955-965.



- Fonseca V, Jawa A (2005). Endothelial and erectile dysfunction, diabetes mellitus, and the metabolic syndrome: common pathways and treatments? *Am. J. Cardiol.* 26:13M-18M.
- Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weißgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B. (2001) Lack of an endothelial store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4 $^{-/-}$  mice. *Nat. Cell Biol.* 3:121-127.
- Frisbee JC, Maier KG, Stepp DW. (2002) Oxidant stress-induced increase in myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283:H2160-H2168.
- Frisbee JC, Stepp DW. (2001) Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281:H1304-H1311.
- Frisbee JC. (2003) Remodeling of the skeletal muscle microcirculation increases resistance to perfusion in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H104-H111.
- Frisbee JC. (2004) Enhanced arteriolar  $\alpha$ -adrenergic constriction impairs dilator responses and skeletal muscle perfusion in obese Zucker rats. *J. Appl. Physiol.* 97:764-772.
- Fulton D, Church JE, Ruan L, Li C, Sood SG, Kemp BE, Jennings IG, Venema RC. (2005) Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83. *J. Biol. Chem.* 280:35943-35952.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 399:597-601.
- Fulton D, Harris MB, Kemp BE, Venema RC, Marrero MB, Stepp DW. (2004) Insulin resistance does not diminish eNOS expression, phosphorylation, or binding to HSP-90. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287:H2384-H2393.
- Fulton D, Ruan L, Sood SG, Li C, Zhang Q, Venema RC. (2008) Agonist-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation and vascular relaxation. Role of eNOS phosphorylation at Tyr83. *Circ. Res.* 102:497-504.
- Fulton DJ, Hodgson WC, Sikorski BW, King RG. (1991) Attenuated responses to endothelin-1, KCl and  $\text{CaCl}_2$ , but not noradrenaline, of aortae from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br. J. Pharmacol.* 104:928-932.
- Gailly P, Colson-Van Schoor M. (2001) Involvement of trp-2 protein in store operated influx of calcium in fibroblasts. *Cell Calcium.* 30:157-165.
- Galione A, Churchill GC. (2002) Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium.* 32:343-354.
- Galione A, White A. (1994)  $\text{Ca}^{2+}$  release induced by cyclic ADP-ribose. *Trends Cell Biol.* 4:431-436.
- Ganitkevich V, Isenberg G. (1990) Contribution of two types of calcium channels to membrane conductance of single myocytes from guinea-pig coronary artery. *J. Physiol.* 426:19-42.
- Ganz MB, Seftel A. (2000) Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278:146-152.
- García-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 392:821-824.
- García-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin.

- Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 272:25437-25440.
- Gasc JM, Shanmugam S, Sibony M, Corvol P. (1994) Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension.* 24:531-537.
- Gazzaruso C, Giordanetti S, De AE, Bertone G, Falcone C, Geroldi D, Fratino P, Solerte SB, Garzaniti A. (2004) Relationship between erectile dysfunction and silent myocardial ischemia in apparently uncomplicated type 2 diabetic patients. *Circulation.* 110:22-26.
- Gerasimenko JV, Maruyama Y, Yano K, Dolman NJ, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV. (2003) NAADP mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J. Cell Biol.* 163:271-282.
- Ghisdal P, Vandenberg G, Morel N. (2003) Rho-dependent kinase is involved in agonist-activated calcium entry in rat arteries. *J. Physiol.* 551:85-867.
- Giuliano F, Bernabe J, Jardin A, Rousseau JP. (1993) Antierectile role of the sympathetic nervous system in rats. *J. Urol.* 150:519-524.
- Goel M, Sinkins WG, Schilling WP. (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 277:48303-48310.
- Gohla A, Schultz G, Offermanns S. (2000) Role for G(12)/G(13) in agonist induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ. Res.* 87:221-227.
- Goldstein AM, Padma-Nathan, H. (1990) The microarchitecture of the intracavernosal smooth muscle and the cavernosal fibrous skeleton. *J. Urol.* 144:1144-1146.
- Goldstein I, Young JM, Fischer J, Bangerter K, Segerson T, Taylor T. (2003) Vardenafil Diabetes Study Group. Vardenafil, a new phosphodiesterase type 5 inhibitor, in the treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a multicenter double-blind placebo-controlled fixed-dose study. *Diabetes Care.* 26:777-783.
- Gollasch, M, Haase H, Ried C, Lindschau C, Morano I, Luft FC, Haller H. (1998) L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 12:593-601.
- Golovina VA, Platoshyn O, Bailey CL, Wang J, Limsuwan A, Sweeney M, Rubin LJ, Yuan JX. (2001) Upregulated TRP and enhanced capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280:H746-H755.
- Golovina VA. (1999) Cell proliferation is associated with enhanced capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human arterial myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 277:C343-C349.
- Gong M, Kinter M, Somlyo AV, Somlyo AP. (1995) Arachidonic acid and diacylglycerol release associated with inhibition of myosin light chain dephosphorylation in rabbit smooth muscle. *J. Physiol.* 486:113-122.
- González De La Fuente P, Savineau JP, Marthan R. (1995) Control of pulmonary vascular smooth muscle tone by sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump blockers: thapsigargin and cyclopiazonic acid. *Pflügers Arch.* 429:617-624.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450.
- Guibert C, Ducret T, Savineau JP. (2008) Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98:10-23.
- Gupta S, Moreland RB, Yang S, Gallant CM, Goldstein I, Traish A. (1998) The expression of functional postsynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the corpus cavernosum smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 123:1237-1245.

- Gur S, Ozturk B, Karahan ST. (2000) Impaired endothelium-dependent and neurogenic relaxation of corpus cavernosum from diabetic rats: improvement with L-arginine. *Urol. Res.* 28:14-19.
- Gustafsson F, Andreassen D, Salomonsson M, Jensen BL, Holstein-Rathlou N. (2001) Conducted vasoconstriction in rat mesenteric arterioles: role for dihydropyridine-insensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280:H582-H590.
- Haas C, Seftel AD, Razmjouei K, Ganz MB, Hampel N, Ferguson K. (1998) Erectile dysfunction in aging: upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Urology.* 51:516-522.
- Haddock RE, Hill CE. (2005) Rhythmicity in arterial smooth muscle. *J. Physiol.* 566:645-656.
- Hakim LS, Goldstein I. (1996) Diabetic sexual dysfunction. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 25:379-400.
- Halcox JP, Nour KR, Zalos G, Mincemoyer RA, Waclawiw M, Rivera CE, Willie G, Ellahham S, Quyyumi AA. (2002) The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40:1232-1240.
- Hale TM, Hannan JL, Carrier S, deBlois D, Adams MA. (2009) Targeting vascular structure for the treatment of sexual dysfunction. *J. Sex. Med.* 3:210-220.
- Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. (2003) Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:1510-1520.
- Harris AK, Hutchinson JR, Sachidanandam K, Johnson MH, DorranceAM, Stepp DW, Fagan SC, Ergul A. (2005) Type 2 diabetes causes remodeling of cerebrovasculature via differential regulation of matrix metalloproteinases and collagen synthesis: role of endothelin-1. *Diabetes.* 54:2638-2644.
- Hayashi T, Su TP. (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulates  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and cell survival. *Cell.* 131:596-610.
- Head RJ, Longhurst P, Panek RL, Stitzel RE. (1987) A contrasting effect of the diabetic state upon the contractile responses of aortic preparations from the rat and rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 91:275-286.
- Hedlund H, Andersson KE. (1985) Comparison of the responses to drugs acting on adrenoreceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. *J. Auton. Pharmacol.* 5:81-88.
- Hedlund P, Alm P, Andersson KE. (1999) NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. *Br. J. Pharmacol.* 127:349-360.
- Hedlund P, Aszodi A, Pfeifer A, Alm P, Hofmann F, Ahmad M, Fassler R, Andersson KE (2000). Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:2349-2354.
- Hedlund P, Ny L, Alm P, Andersson KE. (2000) Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J. Urol.* 164:868-875.
- Hellstrom WJ, Monga M, Wang R, Domer FR, Kadowitz PJ, Roberts JA. (1994) Penile erection in the primate: induction with nitric-oxide donors. *J. Urol.* 151:1723-1727.
- Herrmann-Frank A, Darling E, Meissner G. (1991) Functional characterization of the  $\text{Ca}^{2+}$ -gated  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Arch.* 418:353-359.

- Hetman JM, Robas N, Baxendale R, Fidock M, Phillips SC, Soderling SH, Beavo JA. (2000) Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12891-12895.
- Hill AJ, Hinton JM, Cheng H, Gao Z, Bates DO, Hancox JC, Langton PD, James AF. (2006) A TRPC-like non-selective cation current activated by alpha 1-adrenoceptors in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Cell Calcium*. 40:29-40.
- Hill B, Price E, Dixon J, Sturek M. (2003) Increased calcium buffering in coronary smooth muscle cells from diabetic dyslipidemic pigs. *Atherosclerosis*. 167:15-23.
- Hill MA, Zou H, Potocnik SJ, Meininger GA, Davis MJ. (2001) Arteriolar smooth muscle mechanotransduction:  $Ca^{2+}$  signaling pathways underlying myogenic reactivity. *J. Appl. Physiol*. 91:973-983.
- Himpens B, Casteels R. (1987) Measurement by Quin2 of changes of the intracellular calcium concentration in strips of the rabbit ear artery and of the guinea-pig ileum. *Pflügers Arch*. 408:32-37.
- Himpens B, Kitazawa T, Somlyo AP. (1990) Agonist-dependent modulation of  $Ca^{2+}$  sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflügers Arch*. 417:21-28.
- Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S. (1991) Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor. *Nature*. 349:617-620.
- Hirst GD, Silverberg GD, van Helden DF. (1986) The action potential and underlying ionic currents in proximal rat middle cerebral arterioles. *J. Physiol*. 371:289-304.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*. 397:259-263.
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:7461-7466.
- Holda JR, Blatter LA. (1997) Capacitative calcium entry is inhibited in vascular endothelial cells by disruption of cytoskeletal microfilaments. *FEBS Lett*. 403:191-196.
- Holmquist F, Andersson KE, Hedlund H. (1990) Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Acta Physiol. Scand*. 139:113-122.
- Holmquist F, Hedlund H, Andersson KE. (1992) Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *J. Physiol*. 449:295-311.
- Hoth M, Penner R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. 355:353-356.
- Hsu GL, Brock G, Martínez-Piñero L, Nunes L, Hieden BV, Lue TF. (1992) The three dimensional structure of the human tunica albuginea: anatomical and ultrastructural levels. *Int. J. Impot. Res*. 4:117-129.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem*. 29:577-580.
- Hullin, R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V. (1992) Calcium channel subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J*. 11:885-890.

- Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarity JL, Snyder SH, Burnett AL. (2002) Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:4061-4066.
- Hynes MR, Duling BR. (1991)  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of isolated arterioles from the hamster cheek pouch. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 260:H355-H361.
- Iannuzzi A, De MM, Bond MG, Sacchetti L, Fortunato G, Salvatore F, Mattiello A, Panico S, Rubba P. (2005) Carotid artery remodeling in middle-aged women with the metabolic syndrome (from the "Progetto ATENA" study). *Am. J. Cardiol.* 96:1162-1165.
- Ignarro LJ. (1999) Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci. Rep.* 19:51-71.
- Iino M, Endo M. (1992) Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Nature.* 360:76-78.
- Iino M. (1990) Biphasic  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.* 95:1103-1122.
- Iino M. (1990) Calcium release mechanisms in smooth muscle. *Jpn. J. Pharmacol.* 54:345-354.
- Iino M. (1991) Effects of adenine nucleotides on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release in vascular smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.* 98:681-698.
- Inoue R, Jensen LJ, Shi J, Morita H, Nishida M, Honda A, Ito Y. (2006) Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circ. Res.* 99:119-131.
- Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y. (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular  $\alpha$ -1-adrenoceptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel. *Circ. Res.* 88:325-332.
- Irvine RF. (1990) 'Quantal'  $\text{Ca}^{2+}$  release and the control of  $\text{Ca}^{2+}$  entry by inositol phosphates – a possible mechanism. *FEBS Lett.* 263:5-9.
- Ishikawa T, Hume JR, Keef KD. (1993) Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 73:1128-1137.
- Ito S, Kume H, Yamaki K, Katoh H, Honjo H, Kodama I, Hayashi H. (2002) Regulation of capacitative and noncapacitative receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry by rho-kinase in tracheal smooth muscle. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26:491-498.
- Janssen LJ, Lu-Chao H, Netherton S. (2001) Excitation-contraction coupling in pulmonary vascular smooth muscle involves tyrosine kinase and Rho kinase. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280:L666-L674.
- Jensen LJ, Holstein-Rathlou NH. (2009) Is there a role for T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in regulation of vasomotor tone in mesenteric arterioles?. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87:8-20.
- Jensen PE, Mulvany MJ, Aalkjaer C. (1992) Endogenous and exogenous agonist-induced changes in the coupling between  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and force in rat resistance arteries. *Pflügers Arch.* 420:536-543.
- Jensen PE, Ohanian J, Stausbøl-Grøn B, Buus NH, Aalkjaer C. (1996) Increase by lysophosphatidylcholines of smooth muscle  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in  $\alpha$ -toxin-permeabilized small mesenteric artery from the rat. *Br. J. Pharmacol.* 117:1238-1244.
- Jeremy JY, Angelini GD, Khan M, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Thompson CS, Bruckdorfer KR, Naseem KM. (2000) Platelets, oxidant stress and erectile dysfunction: an hypothesis. *Cardiovasc. Res.* 46:50-54.

- Jeremy JY, Jones RA, Koupparis AJ, Hotston M, Persad R, Angelini GD, Shukla N. (2007) Reactive oxygen species and erectile dysfunction: possible role of NADPH oxidase. *Int. J. Impot. Res.* 19:265-280.
- Jin L, Teixeira CE, Webb RC, Leite R (2008) Comparison of the involvement of protein kinase C in agonist-induced contractions in mouse aorta and corpus cavernosum. *Eur. J. Pharmacol.* 590:363-368.
- Jin L, Ying Z, Webb RC. (2004) Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287:H1495-H1500.
- Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, McKinlay JB. (2000) Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study. *J. Urology.* 163:460-463.
- Jones RW, Rees RW, Minhas S, Ralph D, Persad RA, Jeremy JY. (2002) Oxygen free radicals and the penis. *Expert Opin. Pharm.* 3:889-897.
- Joseph SK, Pierson S, Samanta S. (1995) Trypsin digestion of the Inositol trisphosphate receptor: implications for the conformation and domain organization of the protein. *Biochem. J.* 307:859-865.
- Jung S, Strotmann R, Schultz G, Plant TD. (2002) TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282:C347-C359.
- Kam KL, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. (1993) The influence of high glucose levels and/or hyperosmolarity on rat isolated aorta. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 30:153-157.
- Kamata K, Ozawa Y, Kobayashi T, Matsumoto T. (2008) Effect of long-term streptozotocin-induced diabetes on coronary vasoconstriction in isolated perfused rat heart. *J. Smooth Muscle Res.* 44:177-188.
- Kannan MS, Fenton AM, Prakash YS, and Sieck GC. (1996) Cyclic ADPribose stimulates sarcoplasmic reticulum calcium release in porcine coronary artery smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 270:H801-H806.
- Karaki H, Weiss GB. (1979) Alterations in high and low affinity binding of  $^{45}\text{Ca}$  in rabbit aortic smooth muscle by norepinephrine and potassium after exposure to lanthanum and low temperature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211:86-92.
- Kasri NN, Torok K, Galione A, Garnham C, Callewaert G, Missiaen L, Parys JB, De Smedt H. (2006) Endogenously bound calmodulin is essential for the function of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 281:8332-8338.
- Katakam PV, Tulbert CD, Snipes JA, Erdös B, Miller AW, Busija DW. (2005) Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:H854-H860.
- Keef KD, Hume JR, Zhong J. (2001) Regulation of cardiac and smooth muscle  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Cav1.2a,b) by protein kinases. *Am. J. Physiol.* 281:C1743-C1756.
- Keegan A, Jack AM, Cotter MA, Cameron NE. (2000) Effects of aldose reductase inhibition on responses of the corpus cavernosum and mesenteric vascular bed of diabetic rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35:606-613.
- Khan MA, Morgan RI, Mikhailides DP. (2001) Prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in male rectile dysfunction. *BJU Int.* 88:68-71.

- Kifor I, Williams GH, Vickers MA, Sullivan MP, Jodbert P, Dluhy RG. (1997) Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J. Urol.* 157:1920-1925.
- Kim YC, Kim JH, Davies MG, Hagen PO, Carson CC. (1995) Modulation of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-mediated relaxation by nitric oxide and prostanoids in the rabbit corpus cavernosum. *J. Urol.* 153:807-810.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 273:245-248.
- Kimura M, Osanai T, Okumura K, Suga S, Kanno T, Kamimura N, Horiba N, Wakui M. (2000) Involvement of phosphorylation of  $\gamma$ -subunit in cAMP-dependent activation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel in aortic smooth muscle-derived A7r5 cells. *Cell Signal.* 12:63-70.
- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* 427:360-364.
- Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S. (1999) The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol. Cell.* 4:423-429.
- Kitazawa T, Gaylinn BD, Denney GH, Somlyo AP. (1991) G-protein-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266:1708-1715.
- Knot HJ, Nelson MT. (1998) Regulation of arterial diameter and wall  $[\text{Ca}^{2+}]$  in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J. Physiol.* 508:199-209.
- Komori S, Bolton TB. (1990) Role of G-proteins in muscarinic receptor inward and outward currents in rabbit jejunal smooth muscle. *J. Physiol.* 427:395-419.
- Komori S, Kawai M, Takewaki T, Ohashi H. (1992) GTP-binding protein involvement in membrane currents evoked by carbachol and histamine in guinea-pig ileal muscle. *J. Physiol.* 450:105-126.
- Kovanecz I, Ferrini MG, Vernet D, Nolasco G, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. (2006) Pioglitazone prevents corporal veno-occlusive dysfunction in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *BJU Int.* 98:116-124.
- Kovanecz I, Rambhatla A, Ferrini M, Vernet D, Sanchez S, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid N. (2008) Long-term continuous sildenafil treatment ameliorates corporal veno-occlusive dysfunction (CVD) induced by cavernosal nerve resection in rats. *Int. J. Impot. Res.* 20:202-212.
- Kriegsfeld LJ, Demas GE, Huang PL, Burnett AL, Nelson RJ. (1999) Ejaculatory abnormalities in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase (eNOS $^{-/-}$ ). *Physiol. Behav.* 67:561-566.
- Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H, Takeshita A. (1996) Cell cycle-dependent expression of L- and T-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ. Res.* 79:14-19.
- Kun A, Kiraly I, Pataricza J, Marton Z, Krassoi I, Varro A, Simonsen U, Papp JG, Pajor L. (2008) C-type natriuretic peptide hyperpolarizes and relaxes human penile resistance arteries. *J. Sex. Med.* 5:1114-1125.
- Kun A, Martínez C, Pataricza J, Papp J G, Simonsen U. (2003) Role for  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels in neurogenic contractions induced by electrical field stimulation in rat penile small arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 474:103-115.

- Kunichika N, Yu Y, Remillard CV, Platoshyn O, Zhang S, Yuan JX. (2004) Overexpression of TRPC1 enhances pulmonary vasoconstriction induced by capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287:L962-L969.
- Lagaud GJ, Randriamboavonjy V, Roul G, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. (1999) Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 276:H300-H308.
- Lamont C, Wier WG. (2002) Evoked and spontaneous purinergic junctional  $\text{Ca}^{2+}$  transients (jCaTs) in rat small arteries. *Circ. Res.* 91:454-456.
- Langeveld B, van Gilst WH, Tio RA, Zijlstra F, Roks AJ. (2005) Angiotensin-(1-7) attenuates neointimal formation after stent implantation in the rat. *Hypertension.* 45:138-141.
- Large WA. (2002) Receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 13:493-501.
- Laumann EO, Paik A, Rosen RC. (1999) Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *JAMA.* 281:537-544.
- Laumann EO, Paik A, Rosen RC. (1999) The epidemiology of erectile dysfunction: results from the National Health and Social Life Survey. *Int. J. Impot. Res.* 11:S60-S64.
- Lee CH, Poburko D, Sahota P, Sandhu J, Ruehlmann DO, van Breemen C. (2001) The mechanism of phenylephrine-mediated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava. *J. Physiol.* 534:641-650.
- Lee H. (1994) Cyclic ADP-ribose: a calcium mobilizing metabolite of NAD(+). *Mol. Cell Biochem.* 138:229-235.
- Lee H. (1997) Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol. Rev.* 77:1133-1164.
- Lee SW, Wang HZ, Zhao W, Ney P, Brink PR, Christ GJ. (1999) Prostaglandin E1 activates the large-conductance  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channel in human corporal smooth muscle cells. *Int. J. Impot. Res.* 11:189-199.
- Lee YM, Kim BJ, Kim HJ, Yang DK, Zhu MH, Lee KP, So I, Kim KW. (2003) TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284:G604-G616.
- Lepretre N, Mironneau J. (1994) Alpha 2-adrenoceptors activate dihydropyridine-sensitive calcium channels via Gi-proteins and protein kinase C in rat portal vein myocytes. *Pflügers Arch.* 429:253-261.
- Lesniewski LA, Donato AJ, Behnke BJ, Woodman CR, Laughlin MH, Ray CA, Delp MD. (2008) Decreased NO signaling leads to enhanced vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle arterioles of the ZDF rat prior to overt diabetes and hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294:H1840-H1850.
- Leungwattanakij S, Flynn V Jr, Hellstrom WJ. (2001) Intracavernosal injection and intraurethral therapy for erectile dysfunction. *Urol. Clin. North Am.* 28:343-354.
- Levin RW, Wein AJ. (1980) Adrenergic alpha receptors outnumber beta receptors in human penile corpus cavernosum. *Invest. Urol.* 18:225-226.
- Levy J, Gavi JR, Sowers JR. (1994) Diabetes mellitus: A disease of abnormal cellular calcium metabolism? *Am. J. Med.* 96:260-273.
- Li N, Teggatz EG, Li PL, Allaire R, Zou AP. (2000) Formation and actions of cyclic ADP-ribose in renal microvessels. *Microvasc. Res.* 60:149-159.



- Limbird LE. (1988) Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: An additional signaling mechanism. *FASEB J.* 2:2686-2695.
- Linder AE, Leite R, Lauria K, Mills TM, Webb RC. (2006) Penile erection requires the association of soluble guanylyl cyclase with endothelial caveolin-1 in rat corpus cavernosum. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290:R1302-R1308.
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Meyer T. (2005) STIM is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor essential for  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion triggered  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Curr. Biol.* 15:1235-1241.
- Litjens T, Nguyen T, Castro J, Aromataris EC, Jones L, Barritt GJ, Rychkov GY. (2007) Phospholipase C-gamma1 is required for the activation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in liver cells. *Biochem. J.* 405:269-276.
- Liu X, Farley JM. (1996) Acetylcholine-induced chloride current oscillations in swine tracheal smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276:178-186.
- Liu Y, Gutterman DD. (2002) The coronary circulation in diabetes: Influence of reactive oxygen species on  $\text{K}^+$  channel-mediated vasodilation. *Vasc. Pharmacol.* 38:43-49.
- Lopez J, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. (2006) Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *J. Biol. Chem.* 281:28254-28264.
- Lue TF. (2000) Erectile dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 342:1802-1813.
- Luttrell IP, Swee M, Starcher B, Parks WC, Chitaley K. (2008) Erectile dysfunction in the type II diabetic db/db mouse: impaired venoocclusion with altered cavernosal vasoreactivity and matrix. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294:H2204-H2211.
- Luykenaar KD, Brett SE, Wu BN, Wiehler WB, Welsh DG. (2004) Pyrimidine nucleotides suppress KDR currents and depolarize rat cerebral arteries by activating Rho kinase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286:H1088-H1100.
- Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL. (2000) Requirement of the inositol triphosphate receptor for activation of storeoperated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Science.* 287:1647-1651.
- Macrez-Lepretre N, Kalkbrenner F, Schultz G, Mironneau J. (1997) Distinct functions of Gq and G11 proteins in coupling  $\alpha_1$ -adrenoreceptors to  $\text{Ca}^{2+}$  release and  $\text{Ca}^{2+}$  entry in rat portal vein myocytes. *J. Biol. Chem.* 272:5261-5268.
- Mak DO, McBride S, Foscett JK. (1998) Inositol 1,4,5-trisphosphate activation of inositol trisphosphate receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel by ligand tuning of  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:15821-15825.
- Mak DO, McBride S, Foscett JK. (2001) Regulation by  $\text{Ca}^{2+}$  and inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) of single recombinant type 3 InsP3 receptor channels.  $\text{Ca}^{2+}$  activation uniquely distinguishes types 1 and 3 InsP3 receptors. *J. Gen. Physiol.* 117:435-446.
- Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP. (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat. Cell Biol.* 7:179-185.
- Martínez MC, Randriamboavonjy V, Ohlmann P, Komaz N, Duarte J, Schneider F, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. (2000) Involvement of protein kinase C, tyrosine kinases, and Rho kinase in  $\text{Ca}^{2+}$  handling of human small arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279:H1228-H1238.
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *J. Biochem.* 122:498-505.

- Maruyama Y, Nakanishi Y, Walsh EJ, Wilson DP, Welsh DG, Cole WC. (2006) Heteromultimeric TRPC6–TRPC7 channels contribute to arginine vasopressin induced cation current of A7r5 vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 98:1520-1527.
- Masuo M, Reardon S, Ikebe M, Kitazawa T. (1994) A novel mechanism for the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitizing effect of protein kinase C on vascular smooth muscle: inhibition of myosin light chain phosphatase. *J. Gen. Physiol.* 104:265-286.
- Matsuda JJ, Volk KA, Shibata EF. (1990) Calcium currents in isolated rabbit coronary arterial smooth muscle myocytes. *J. Physiol.* 427:657-680.
- Mazo E, Gamidov S, Anranovich S, Iremashvili V. (2006) Testing endothelial function of brachial and cavernous arteries in patients with erectile dysfunction. *J. Sex. Med.* 3:323-330.
- McCloskey C, Cagney V, Large R, Hollywood M, Sergeant G, McHale N, Thornbury K. (2009) Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  Currents Contribute to Spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  Waves in Rabbit Corpus Cavernosum Myocytes. *J. Sex. Med.* 6:3019-3031.
- McDaniel SS, Platoshyn O, Wang J, Yu Y, Sweeney M, Krick S, Rubin LJ, Yuan JX. (2001) Capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280:L870-L880.
- McFadzean I, Gibson A. (2002) The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 135:1-13.
- McNamara DB, Champion HC, Kadowitz PJ. (1998) Pharmacologic management of peripheral vascular disease. *Surg. Clin. North Am.* 78:447-464.
- Meisneri KD, Hwang O, van Breemen C. (1981) Evidence for two separated  $\text{Ca}^{2+}$  pathways in smooth muscle plasmalemma. *J. Membr. Biol.* 59:19-25.
- Meves H. (1994) Modulation of ion channels by arachidonic acid. *Prog. Neurobiol.* 43: 175-186.
- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 272:15583-15586.
- Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. (2001) Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276:17625-17628.
- Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, Huang W, Venema RC, Kemp BE. (2002) Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J. Biol. Chem.* 277:42344-42351.
- Michikawa T, Hamanaka H, Otsu H, Yamamoto A, Miyawaki A, Furuichi T, Tashiro Y, Mikoshiba K. (1994) Transmembrane topology and sites of N-glycosylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 269:9184-9189.
- Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ. (2007) STIM1 regulates  $\text{Ca}^{2+}$  entry via arachidonate-regulated  $\text{Ca}^{2+}$ -selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *J. Physiol.* 579:703-715.
- Mills TM, Chitaley K, Lewis RW, Webb RC. (2002) Nitric oxide inhibits RhoA/Rho-kinase signaling to cause penile erection. *Eur. J. Pharmacol.* 439:173-174.
- Mills TM, Chitaley K, Lewis RW. (2001a) Vasoconstrictors in erectile physiology. *Int. J. Impot. Res.* 13:S29-S34.
- Mills TM, Lewis RW, Stopper VS, Reilly CM. (1998) The loss of alpha-adrenergic effect during the erectile response in the long-term diabetic rat. *J. Androl.* 19:473-478.

- Mills TM, Pollock DM, Lewis RW, Branam HS, Wingard CJ. (2001b) Endothelin-1-induced vasoconstriction is inhibited during erection in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281:R476-R483.
- Mills TM. (2002) Vasoconstriction and vasodilation in erectile physiology. *Curr. Urol. Rep.* 3:477-483.
- Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, Yang Z. (2002) Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol. Cell Biol.* 22:8467-8477.
- Missiaen L, Taylor CW, Berridge MJ. (1992) Luminal  $\text{Ca}^{2+}$  promoting spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release from inositol trisphosphate-sensitive stores in rat hepatocytes. *J. Physiol.* 455:623-640.
- Mita M, Yanagihara H, Hishinuma S, Saito M, Walsh MP. (2002) Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem. J.* 364:431-440.
- Miyakawa T, Mizushima A, Hirose K, Yamazawa T, Bezprozvanny I, Kurosaki T, Iino M. (2001)  $\text{Ca}^{2+}$ -sensor region of IP3 receptor controls intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *EMBO J.* 20:1674-1680.
- Mizusawa H, Hedlund P, Håkansson A, Alm P, Andersson KE. (2001) Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. *Br. J. Pharmacol.* 132:1333-1341.
- Moien-Afshari F, Ghosh S, Elmi S, Khazaei M, Rahman MM, Sallam N, Laher I. (2008) Exercise restores coronary vascular function independent of myogenic tone or hyperglycemic status in db/db mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295:H1470-H1480.
- Moncada S. (1997) Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann. N Y Acad. Sci.* 811:60-67.
- Montalvo GB, Artalejo AR, Gilabert JA. (2006) ATP from subplasmalemmal mitochondria controls  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of CRAC channels. *J. Biol. Chem.* 281:35616-35623.
- Montorsi F, Briganti A, Salonia A, Deho' F, Zanni G, Cestari A, Guazzoni G, Rigatti P, Stief C. (2003) The ageing male and erectile dysfunction. *BJU Int.* 92:516-520.
- Montorsi F, Briganti A, Salonia A, Rigatti P, Margonato A, Macchi A, Galli S, Ravagnani PM, Montorsi P. (2003) Erectile dysfunction prevalence, time of onset and association with risk factors in 300 consecutive patients with acute chest pain and angiographically documented coronary artery disease. *Eur. Urol.* 44:360-364.
- Montorsi P, Montorsi F, Schulman CC. (2003) Is erectile dysfunction the "tip of the iceberg" of a systemic vascular disorder? *Eur. Urol.* 44:352-354.
- Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, Rotatori F, Briganti A, Salonia A, Rigatti P, Montorsi F. (2005) The artery size hypothesis: a macrovascular link between erectile dysfunction and coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 96:19M-23M.
- Moreland RB, Hsieh G, Nakane M, Brioni JD. (2001b) The biochemical and neurologic basis for the treatment of male erectile dysfunction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296:225-234.
- Morton JS, Daly CJ, Jackson VM, McGrath JC. (2007) Alpha(1A)-adrenoceptors mediate contractions to phenylephrine in rabbit penile arteries. *Br J Pharmacol.* 150:112-120.
- Mueed I, Zhang L, MacLeod KM. (2005) Role of the PKC/CPI-17 pathway in enhanced contractile responses of mesenteric arteries from diabetic rats to alpha-adrenoceptor stimulation. *Br. J. Pharmacol.* 146:972-982.

- Mulhall JP, Montorsi F. (2006) Evaluating preference trials of oral phosphodiesterase 5 inhibitors for erectile dysfunction. *Eur. Urol.* 49:30-37.
- Mulhall JP, Müller A, Donohue JF, Mullerad M, Kobylarz K, Paduch DA, Tal R, Li PS, Cohen-Gould L, Scardino PT. (2008) The functional and structural consequences of cavernous nerve injury are ameliorated by sildenafil citrate. *J. Sex. Med.* 5:1126-1136.
- Mulhern M, Docherty JR. (1989) Effects of experimental diabetes on the responsiveness of rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 97:1007-1012.
- Mulvany MJ, Halpern W. (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.* 41:19-26.
- Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y. (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ. Res.* 93:829-838.
- Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. (2005a) Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:11870-11875.
- Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. (2005b) Age-related changes in phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in the rat penis. *J. Sex. Med.* 2:347-357.
- Musicki B, Liu T, Strong T, Jin L, Laughlin MH, Turk JR, Burnett AL. (2008) Low-fat diet and exercise preserve eNOS regulation and endothelial function in the penis of early atherosclerotic pigs: a molecular analysis. *J. Sex. Med.* 5:552-561.
- Naganobu K, Ito K. (1994) Handling of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  by the sarcoplasmic reticulum during  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated contraction of rat mesenteric resistance arteries. *Jpn. J. Pharmacol.* 64:89-96.
- Naik JS, Xiang L, Hester RL. (2006) Enhanced role for RhoA-associated kinase in adrenergic-mediated vasoconstriction in gracilis arteries from obese Zucker rats. 290:R154-R161.
- Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. (2003) Protein kinase C beta inhibition and aorta and corpus cavernosum function in streptozotocin-diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 475:99-106.
- Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. (2006a) Correction of nitrenergic neurovascular dysfunction in diabetic mouse corpus cavernosum by p38 mitogen activated protein kinase inhibition. *Int. J. Impot. Res.* 18:258-263.
- Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. (2006b) IkappaB kinase 2 inhibition corrects defective nitrenergic erectile mechanisms in diabetic mouse corpus cavernosum. *Urology.* 68:214-218.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79:1193-1226.
- Neylon CB, Richards SM, Larsen MA, Agrotis A, Bobik A. (1995) Multiple types of ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channels are expressed in vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:814-821.
- Ng LC, Gurney AM. (2001) Store-operated channels mediate  $\text{Ca}^{2+}$  influx and contraction in rat pulmonary artery. *Circ. Res.* 89:923-929.
- Nicholls DG, Crompton M. (1980) Mitochondrial calcium transport. *FEBS Lett.* 111:261-268.
- Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Takeda R, Omata M, Fujita T, Nagai R, Kitamura T, Hirata Y. (2005) Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:H1770-H1776.

- Nobe K, Paul RJ. (2001) Distinct pathways of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization in porcine coronary artery: effects of Rho-related kinase and protein kinase C inhibition on force and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Circ. Res.* 88:1283-1290.
- Nomura Y, Asano M, Ito K, Uyama Y, Imaizumi Y, Watanabe M. (1997) Potent vasoconstrictor actions of cyclopiazonic acid and thapsigargin on femoral arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 120:65-73.
- Nunn DL, Taylor CW. (1992) Luminal  $\text{Ca}^{2+}$  increases the sensitivity of  $\text{Ca}^{2+}$  stores to inositol 1,4,5-trisphosphate. *Mol. Pharmacol.* 41:115-119.
- Nyborg NC. (1990) Action of noradrenaline on isolated proximal and distal coronary arteries of rat: selective release of endothelium-derived relaxing factor in proximal arteries. *Br. J. Pharmacol.* 100:552-556.
- Ohanian J, Cunliffe P, Ceppi E, Alder A, Heerkens E, Ohanian V. (2001) Activation of p38 mitogen-activated protein kinases by endothelin and noradrenaline in small arteries, regulation by calcium influx and tyrosine kinases, and their role in contraction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1921-1927.
- Ohta T, Kawai K, Ito S, Nakazato Y. (1995)  $\text{Ca}^{2+}$  entry activated by emptying of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in ileal smooth muscle of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 114:1165-1170.
- Ohya Y, Abe I, Fujii K, Takata Y, Fujishima M. (1993) Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* 73: 1090-1099.
- Okamura T, Ayajiki K, Toda N. (1998) Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves. *Am. J. Physiol.* 274:H1075-H1081.
- Okon EB, Chung AW, Rauniyar P, Padilla E, Tejerina T, McManus BM, Luo H, van BC. (2005) Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 54:2415-2423.
- Okon EB, Szado T, Laher I, McManus B, van Breemen C. (2003) Augmented contractile response of vascular smooth muscle in a diabetic mouse model. *J. Vasc. Res.* 40:520-530.
- Oltman CL, Richou LL, Davidson EP, Coppey LJ, Lund DD, Yorek MA. (2006) Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291:H1780-H1787.
- Ong HL, Liu X, Tsaneva-Atanasova K, Singh BB, Bandyopadhyay BC, Swaim WD, Russell JT, Hegde RS, Sherman A, Ambudkar IS. (2007) Relocalization of STIM1 for activation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is determined by the depletion of subplasma membrane endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  store. *J. Biol. Chem.* 282:12176-12185.
- Oritani K, Kincade PW. (1996) Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *J. Cell Biol.* 134:771-782.
- Osmond JM, Mintz JD, Dalton B, Stepp DW. (2009) Obesity increases blood pressure, cerebral vascular remodeling, and severity of stroke in the Zucker rat. *Hypertension.* 53:381-386.
- Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. (2006) Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68:685-717.
- Pacher P, Thomas AP, Hajnoczky G. (2002)  $\text{Ca}^{2+}$  marks: Miniature calcium signals in single mitochondria driven by ryanodine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:2380-2385.
- Parekh AB, Penner R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* 77:901-930.
- Parekh AB, Putney JW. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* 5:757-810.
- Park JK, Kim SZ, Kim SH, Park YK, Cho KW. (1997) Renin angiotensin system in rabbit corpus cavernosum: Functional characterization of angiotensin II receptors. *J. Urol.* 158:653-658.

- Parker I, Yao Y. (1991) Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. *Proc. Biol. Sci.* 246:269-274.
- Parker NJ, Begley CG, Smith PJ, Fox RM. (1996) Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5. *Genomics.* 37:253-256.
- Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium.* 38:233-252.
- Pérez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH. (1998) Molecular characterization of a neuronal low voltage-activated T-type calcium channel. *Nature.* 391:896-900.
- Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, Kinet JP. (2006) Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat. Cell Biol.* 8:771-773.
- Peppiatt-Wildman CM, Albert AP, Saleh SN, Large WA. (2007) Endothelin-1 activates a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel with TRPC3 and TRPC7 properties in rabbit coronary artery myocytes. *J. Physiol.* 580:755-764.
- Perez JF, Sanderson MJ. (2005) The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACH, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles. *J. Gen. Physiol.* 125:535-553.
- Petkov GV, Fusi F, Saponara S, Gagov HS, Sgaragli GP, Boev KK. (2001) Characterization of voltage-gated calcium currents in freshly isolated smooth muscle cells from rat tail main artery. *Acta Physiol. Scand.* 173:257-265.
- Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, Zhang C. (2006) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ. Res* 99:69-77.
- Poburko D, Kuo KH, Dai J, Lee CH, van Breemen C. (2004) Organellar junctions promote targeted  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in smooth muscle: why two membranes are better than one. *Trends Pharmacol. Sci.* 25:8-15.
- Podlasek CA, Gonzalez CM, Zelner DJ, Jiang HB, McKenna KE, McVary KT. (2001) Analysis of NOS isoform changes in a post radical prostatectomy model of erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 13:S1-S15.
- Potocnik SJ, Hill MA. (2001) Pharmacological evidence for capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in cannulated and pressurized skeletal muscle arterioles. *Br. J. Pharmacol.* 134:247-256.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. (1994) Calcium channel  $\beta$ -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha_1$ -subunit. *Nature.* 368:67-70.
- Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature.* 443:230-233.
- Prieto D, Arcos LR, Martínez P, Benedito S, García-Sacristán A, Hernández M. (2004) Heterogeneity of the neuropeptide Y (NPY) contractile and relaxing receptors in horse penile small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 143:976-986.
- Prieto D, Buus CL, Mulvany MJ, Nilsson H. (2000) Neuropeptide Y regulates intracellular calcium through different signalling pathways linked to a Y(1)-receptor in rat mesenteric small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 129:1689-1699.
- Prieto D, Rivera L, Recio P, Rubio JL, Hernández M, García-Sacristán A. (2006) Role of nitric oxide in the relaxation elicited by sildenafil in penile resistance arteries. *J. Urol.* 175:1164-1170.

- Prieto D, Simonsen U, Hernández M, García-Sacristán A. (1998) Contribution of K<sup>+</sup> channels and ouabain-sensitive mechanisms to the endothelium-dependent relaxations of horse penile small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 123:1609-1620.
- Prieto D. (2008) Physiological regulation of penile arteries and veins. (2008) *Int. J. Impot. Res.* 20:17-29.
- Pritchard KA, Ackerman AW, Ou J, Curtis M, Smalley DM, Fontana JT, Stemerman MB, Sessa WC. (2002) Native low-density lipoprotein induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction: role of heat shock protein 90 and caveolin-1. *Free Radic. Biol. Med.* 33:52-62.
- Putney JW. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1-12.
- Putney JW. (1987) Formation and actions of calcium-mobilizing messenger inositol 1,4,5 trisphosphate. *Am. J. Physiol.* 252:149-157.
- Putney JW. (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* 11:611-624.
- Putney JW. (2001) Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol. Interv.* 1:84-94.
- Quignard JF, Frapier JM, Harricane MC, Albat B, Nargeot J, Richard S. (1997) Voltage-gated calcium channel currents in human coronary myocytes. Regulation by cyclic GMP and nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 99:185-193.
- Quignard JF, Harricane MC, Menard C, Lory P, Nargeot J, Capron L, Mornet D, Richard S. (2001) Transient down-regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel and dystrophin expression after balloon injury in rat aortic cells. *Cardiovasc. Res.* 49:177-188.
- Rajasekaran M, Kasyan A, Jain A, Kim SW, Monga M. (2002) Altered growth factor expression in the aging penis: the Brown-Norway rat model. *J. Androl.* 23:393-399.
- Rapizzi E, Pinton P, Szabadkai G, Wieckowski MR, Vandecasteele G, Baird G, Tuft RA, Fogarty KE, Rizzuto R. (2002) Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca<sup>2+</sup> microdomains to mitochondria. *J. Cell Biol.* 159:613-624.
- Reading SA, Brayden JE. (2007) Central role of TRPM4 channels in cerebral blood flow regulation. *Stroke.* 38:2322-2328.
- Reading SA, Earley S, Waldron BJ, Welsh DG, Brayden JE. (2005) TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:H2055-H2061.
- Rebecchi MJ, Pentyala SN. (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 80:1291-1335.
- Rees RW, Ralph DJ, Royle M, Moncada S, Cellet S. (2001) Y-27632, an inhibitor of Rho-kinase, antagonizes noradrenergic contractions in the rabbit and human penile corpus cavernosum. *Br. J. Pharmacol.* 133:455-458.
- Riccio A, Mattei C, Kelsell RE, Medhurst AD, Calver AR, Randall AD, Davis JB, Benham CD, Pangalos MN. (2002) Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Biol. Chem.* 277:12302-12309.
- Richard S, Nargeot J. (1998) T-type calcium currents in vascular smooth muscle cells: a role in cellular proliferation? In: *Low Voltage-activated T-type Calcium Channels*, edited by Tsien RW, Clozel JP, and Nargeot J. Chester, UK: Adis International, p. 123-132.
- Richard S, Neveu D, Carnac G, Bodin P, Travo P, Nargeot J. (1992) Differential expression of voltage-gated Ca<sup>2+</sup>-currents in cultivated aortic myocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1160: 95-104.
- Ridray S. (1995) Hyperinsulinemia and smooth muscle cells proliferation. *Int. J. Obesity.* 19:S39-S51.

- Rikitake Y, Liao JK. (2005) Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ. Res.* 97:1232-1235.
- Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Rodella L, Bianchi R, Sleiman I, Rosei EA. (2001) Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.* 103:1238-1244.
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  responses. *Science.* 280:1763-1766.
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel function. *J. Cell Biol.* 169:435-445.
- Ross CA, Danoff SK, Schell MJ, Snyder SH, Ullrich A. (1992) Three additional inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: molecular cloning and differential localization in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:4265-4269.
- Ross R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 362:801-809.
- Rottenberg H, Marbach M. (1990) The  $\text{Na}^{+}$ -independent  $\text{Ca}^{2+}$  efflux system in mitochondria is a  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$  exchange system. *FEBS Lett.* 274:65-68.
- Ruiz Rubio JL, Hernández M, Rivera de los Arcos L, Benedito S, Recio P, García P, García-Sacristán A, Prieto D. (2004a) Role of ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channels in relaxation of penile resistance arteries. *Urology.* 63:800-805.
- Ruiz Rubio JL, Hernández M, Rivera de los Arcos L, Martínez AC, García-Sacristán A, Prieto D. (2004b) Mechanisms of prostaglandin E1-induced relaxation in penile resistance arteries. *J. Urol.* 171:968-973.
- Ruiz-Ortega M, Ortiz A. (2005) Angiotensin II and reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* 7:1258-1260.
- Ruiz-Velasco, V, Zhong J, Hume JR, Keef KD. (1998) Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ. Res.* 82:557-565.
- Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, Faraci FM, Sigmund CD. (2004) Angiotensin II-induced vascular dysfunction is mediated by the AT1A receptor in mice. *Hypertension.* 43:1074-1079.
- Ryu JK, Cho CH, Shin HY, Song SU, Oh SM, Lee M, Piao S, Han JY, Kim IH, Koh GY, Suh JK. (2006a) Combined angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor gene transfer restores cavernous angiogenesis and erectile function in a rat model of hypercholesterolemia. *Mol. Ther.* 13:705-715.
- Ryu JK, Shin HY, Song SU, Oh SM, Piao S, Han JY, Park KW, Suh JK. (2006b) Downregulation of angiogenic factors and their downstream target molecules affects the deterioration of erectile function in a rat model of hypercholesterolemia. *Urology.* 67:1329-1334.
- Sáenz de Tejada I, Angulo J, Celtek S, González-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, Simonsen U. (2004) Physiology of erectile function. *J. Sex. Med.* 1:254-265.
- Sáenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzi K, Krane RJ, Cohen RA. (1989a) Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N. Engl. J. Med.* 320:1025-1030.
- Sáenz de Tejada I, Kim N, Lagan I, Krane RJ, Goldstein I. (1989b) Regulation of adrenergic activity in penile corpus cavernosum. *J. Urol.* 142:1117-1121.



- Sáenz de Tejada, Allona Almagro A. (1997) Erección, eyaculación y sus trastornos. Ed. Fomento Salud.
- Sakurada S, Takuwa N, Sugimoto N, Wang Y, Seto M, Sasaki Y, Takuwa Y. (2003)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res.* 93:548-556.
- Saleh SN, Albert AP, Peppiatt-Wildman CM, Large WA. (2008) Diverse properties of store-operated TRPC channels activated by protein kinase C in vascular myocytes. *J. Physiol.* 586:2463-2476.
- Sánchez A, Contreras C, Villalba N, Martínez MP, Martínez AC, Briones A, Salaices M, García-Sacristán A, Hernández M, Prieto D. (2010) Altered arachidonic acid metabolism via COX-1 and COX-2 contributes to the endothelial dysfunction of penile arteries from obese Zucker rats. *Br. J. Pharmacol.* 159:604-616.
- Sánchez A, Villalba N, Martínez AC, García-Sacristán A, Hernández M, Prieto D. (2008) Mechanisms of the relaxant effect of vardenafil in rat penile arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 586:283-287.
- Sanders KM. (2001) Invited review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J. Appl. Physiol.* 91:1438-1449.
- Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, Loirand G, Pacaud P. (2003) RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 278:9472-9480.
- Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, Loirand G, Pacaud P. (2003) RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 278:9472-9480.
- Schuhmann K, Groschner K. (1994) Protein kinase-C mediates dual modulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in human vascular smooth muscle. *FEBS Lett.* 341:208-212.
- Scotland RS, Chauhan S, Davis C, De Felipe C, Hunt S, Kabir J, Kotsonis P, Oh U, Ahluwalia A. (2004) Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction. *Circ. Res.* 95:1027-1034.
- Seeger W, Röhrenbach M, Ernst C, Neuhof H. (1987) Differential influence of calcium channel-blockers on prostanoid generation and thromboxane-mediated vasoconstriction in rabbit lungs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242:646-653.
- Sekiguchi F, Shimamura K, Akashi M, Sunano S. (1996) Effects of cyclopiazonic acid and thapsigargin on electromechanical activities and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in smooth muscle of carotid artery of hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 118:857-864.
- Sessa WC. (2004) eNOS at a glance. *J. Cell Sci.* 117:2427-2429.
- Shi QY, Cox RH. (1995) GTP requirement for isoproterenol activation of calcium channels in vascular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 269:H195-H202.
- Shiga N, Hirano K, Hirano M, Nishimura J, Nawata H, Kanaide H. (2005) Long-term inhibition of RhoA attenuates vascular contractility by enhancing endothelial NO production in an intact rabbit mesenteric artery. *Circ. Res.* 96:1014-1021.
- Shimamura K, Kusaka M, Sperelakis N. (1994) Protein kinase C stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  current in pregnant rat myometrial cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72:1304-1307.
- Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, Todoroki-Ikeda N, Mogami K, Mizukami Y, Kuriyama S, Haze K, Suzuki M, and Kobayashi S. (2002) Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated  $\text{Ca}^{2+}$

- sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ. Res.* 91:112-119.
- Shmygol A, Wray S. (2005) Modulation of agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release by SR  $\text{Ca}^{2+}$  load: direct SR and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  measurements in rat uterine myocytes. *Cell Calcium.* 37:215-223.
- Short AD, Bian J, Ghosh TK, Waldron RT, Rybak SL, Gill DL. (1993) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pool content is linked to control of cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:4986-4990.
- Shoshan-Barmatz V, Gincel D. (2003) The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem. Biophys.* 39:279-292.
- Shuai J, Rose HJ, Parker I. (2006) The number and spatial distribution of IP3 receptors underlying calcium puffs in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 91:4033-4044.
- Simonsen U, García-Sacristán A, Prieto D. (2002) Penile arteries and erection. *J. Vasc. Res.* 39:283-303.
- Simonsen U, Prieto D, Hernández M, Sáenz de Tejada I, García-Sacristán A. (1997) Adrenoceptor-mediated regulation of the contractility in horse penile resistance arteries. *J. Vasc. Res.* 34:90-102.
- Simonsen U, Prieto D, Sáenz de Tejada I, García-Sacristán A. (1995) Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive  $\text{K}^{+}$ -channels. *Br. J. Pharmacol.* 116:2582-2590.
- Smirnov SV, Aaronson PI. (1992)  $\text{Ca}^{2+}$  currents in single myocytes from human mesenteric arteries: evidence for a physiological role of L-type channels. *J. Physiol.* 457:455-475.
- Smirnov SV, Aaronson PI. (1992)  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated and voltage-gated  $\text{K}^{+}$  currents in smooth muscle cells isolated from human mesenteric arteries. *J. Physiol.* 457:431-454.
- Smith JS, Coronado R, Meissner G. (1986) Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by  $\text{Ca}^{2+}$  and ATP and modulation by  $\text{Mg}^{2+}$ . *J. Gen. Physiol.* 88:573-588.
- Snetkov VA, Aaronson PI, Ward JP, Knock GA, Robertson TP. (2003) Capacitative calcium entry as a pulmonary specific vasoconstrictor mechanism in small muscular arteries of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 140:97-106.
- Snetkov VA, Knock GA, Baxter L, Thomas GD, Ward JP, Aaronson PI. (2006) Mechanisms of the prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$ -induced rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in rat intrapulmonary arteries. *J. Physiol.* 571:147-163.
- So I, Chae MR, Kim SJ, Lee SW. (2005) Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces the change of calcium mobilization via TRPC ion channels in cultured human corporal smooth muscle cells. *Int. J. Impot. Res.* 17:475-483.
- Soboloff J, Spassova M, Xu W, He LP, Cuesta N, Gill DL. (2005) Role of endogenous TRPC6 channels in  $\text{Ca}^{2+}$  signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 280:39786-39794.
- Soboloff J, Spassova MA, Hewavitharana T, He LP, Xu W, Johnstone LS, Dziadek MA, Gill DL. (2006) STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Curr. Biol.* 16:1465-1470.
- Solomon H, Man JW, Jackson G. (2003) Erectile dysfunction and the cardiovascular patient: endothelial dysfunction is the common denominator. *Heart.* 89:251-253.
- Somlyo AP, Somlyo AV. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 372:231-236.

- Somlyo AP, Somlyo AV. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.* 522:177-185.
- Somlyo AP, Somlyo AV. (2003)  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* 83:1325-1358.
- Sommer F, Engelmann UH. (2004) What are the long term effects on erectile function of taking sildenafil on a daily basis?. [abstract 1192] *J. Urol.* 171:375.
- Sommer F, Klotz T, Steinritz D, Schmidt A, Addicks K, Engelmann U, Bloch W. (2002) MAP kinase 1/2 (Erk 1/2) and serine/threonine specific protein kinase Akt/PKB expression and activity in the human corpus cavernosum. *Int. J. Impot. Res.* 14:217-225.
- Spasova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, Gill DL. (2006) A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:16586-16591.
- Stanarius A, Uckert S, Machtens SA, Stief CG, Wolf G, Jonas U. (2001) Immunocytochemical distribution of nitric oxide synthase in the human corpus cavernosum: an electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Urol. Res.* 29:168-172.
- Stepp DW, Pollock DM, Frisbee JC. (2004) Low-flow vascular remodeling in the metabolic syndrome X. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286:H964-H970.
- Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron.* 29:645-655.
- Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. (2003) Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J. Biol. Chem.* 278:39014-39019.
- Suh JK, Mun KH, Cho CK, Shin HC, Kim YS, Park TC. (1995) Effect of vasoactive intestinal peptide and acetylcholine on penile erection in the rat in vivo. *Int. J. Impot. Res.* 7:111-118.
- Sullivan ME, Dashwood MR, Thompson CS, Muddle JR, Mikhailidis DP, Morgan RJ. (1997) Alterations in endothelin B receptor sites in cavernosal tissue of diabetic rabbits: potential relevance to the pathogenesis of erectile dysfunction. *J. Urol.* 158:1966-1972.
- Sullivan ME, Keoghane SR, Miller MA. (2001) Vascular risk factors and erectile dysfunction. *87:838-845.*
- Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, Khan MA, Jeremy JY, Morgan RJ, Mikhailidis DP. (1999) Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? *Cardiovasc. Res.* 43:658-665.
- Suzuki H. (1985) Electrical responses of smooth muscle cells of the rabbit ear artery to adenosine triphosphate. *J. Physiol.* 359:401-415.
- Swärd K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ, Walsh MP. (2000) Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J. Physiol.* 1:33-49.
- Sweeney M, McDaniel SS, Platoshyn O, Zhang S, Yu Y, Lapp BR, Zhao Y, Thistlethwaite PA, Yuan JX. (2002) Role of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in bronchial contraction and remodeling. *J. Appl. Physiol.* 91:1594-1602.
- Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R. (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J. Cell Biol.* 175:901-911.
- Szado T, Kuo KH, Bernard-Helary K, Poburko D, Lee CH, Seow C, Ruegg UT, van Breemen C. (2003) Agonist-induced mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transients in smooth muscle. *FASEB J.* 17:28-37.

- Takahashi R, Nishimura J, Hirano K, Naito S, Kanaide H. (2003) Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity regulates contractility of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *J. Urol.* 169:2412-2416.
- Tan W, Colombini M. (2007) VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768:2510-2515.
- Tazzeo T, Miller J, Janssen LJ. (2003) Vasoconstrictor responses, and underlying mechanisms, to isoprostanes in human and porcine bronchial arterial smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 140:759-763.
- Tewari K, Simard JM. (1997) Sodium nitroprusside and cGMP decrease  $\text{Ca}^{2+}$  channel availability in basilar artery smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 433:304-311.
- Thebault S, Roudbaraki M, Sydorenko V, Shuba Y, Lemonnier L, Slomianny C, Dewailly E, Bonnal JL, Mauroy B, Skryma R, Prevarskaia N. (2003)  $\alpha_1$ -Adrenergic receptors activate  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 111:1691-1701.
- Tiffany L. Thai, Grant C. Churchill, William J. Arendshorst. (2009) NAADP receptors mediate calcium signaling stimulated by endothelin-1 and norepinephrine in renal afferent arterioles. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 297:F510-F516.
- Tiruppathi C, Freichel M, Vogel SM, Paria BC, Mehta D, Flockerzi V, Malik AB. (2002) Impairment of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in TRPC4-/- mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ. Res.* 91:70-76.
- Tiwari S, Zhang Y, Heller J, Abernethy DR, Soldatov NM. (2006) Atherosclerosis-related molecular alteration of the human Cav1.2 calcium channel  $\alpha_1\text{C}$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:17024-17029.
- Toblli J, Cao G, Lombraña A, Rivero M. (2007) Functional and morphological improvement in erectile tissue of hypertensive rats by long-term combined therapy with phosphodiesterase type 5 inhibitor and losartan. *J. Sex. Med.* 4:1291-1303.
- Toblli JE, Stella I, Inserra F, Ferder L, Zeller F, Mazza ON. (2000) Morphological changes in cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 13:686-692.
- Toblli JE, Stella I, Mazza ON, Ferder L, Inserra F. (2004) Candesartan cilexetil protects cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats. *Int. J. Impot. Res.* 16:305-312.
- Toma C, Jensen P, Prieto D, Hugues A, Mulvany MJ, Aalkjaer C. (1995) Effects of tyrosine kinase inhibitors on the contractility of rat mesenteric resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.* 114:1266-1272.
- Tosun M, Paul RJ, Rapoport RM. (1998) Coupling of store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry to contraction in rat aorta. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 285:759-766.
- Traish AM, Carson MP, Kim N, Goldstein I, Sáenz de Tejada I. (1990) Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in human penile corpus cavernosum: studies on whole tissue and cultured endothelium. *J. Urol.* 144:1036-1040.
- Traish AM, Moreland RB, Gallant C, Huang YH, Goldstein I. (1997) G-protein-coupled receptor agonists augment adenylyl cyclase activity induced by forskolin in human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Recept. Signal. Transduct.* 7:121-132.
- Traish AM, Palmer MS, Goldstein I and Moreland RB (1995c) Expression of functional muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells. *Receptor.* 5:159-176.

- Trepakova ES, Gericke M, Hirakawa Y, Weisbrod RM, Cohen RA, Bolotina VM. (2001) Properties of a native cation channel activated by  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276:7782-7790.
- Tsien RY, Pozzan T. (1989) Measurement of Cytosolic Free  $\text{Ca}^{2+}$  with Quin2. *Method in Enzymology.* 172:230-244.
- Tsiokas L, Arnould T, Zhu C, Kim E, Walz G, Sukhatme VP. (1999) Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3934-3939.
- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 389:990-994.
- Ungvari Z, Pacher P, Kecskemeti V, Papp G, Szollár L, Koller A. (1999) Increased myogenic tone in skeletal muscle arterioles of diabetic rats. Possible role of increased activity of smooth muscle  $\text{Ca}^{2+}$  channels and protein kinase C. *Cardiovasc. Res.* 43:1018-1028.
- Urban NH, Berg KM, Ratz PH. (2003) K depolarization induces RhoA kinase translocation to caveolae and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization of arterial muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285:C1377-C1385.
- Ureña J, del Valle-Rodríguez A, López-Barneo J. (2007) Metabotropic  $\text{Ca}^{2+}$  channel-induced calcium release in vascular smooth muscle: *Cell Calcium.* 42:513-520.
- Van Breemen C, Aaronson P, Loutzenhiser R. (1978) Sodium-calcium interactions in mammalian smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 30:167-208.
- van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. (2000)  $\text{Ca}^{2+}$  entry mediated by store depletion, S-nitrosylation, and TRP3 channels. Comparison of coupling and function. *J. Biol. Chem.* 275:28562-28568.
- Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L. (1999) Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:2060-2064.
- Vardi Y. (2009) Microvascular complications in diabetic erectile dysfunction: do we need other alternatives? *Diabetes Care.* 32:S420-S422.
- Vennekens R, Owsianik G, Nilius B. (2008) Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Curr. Pharm. Des.* 14:18-31.
- Vickers MA, Wright EA. (2004) Erectile dysfunction in the patient with diabetes mellitus. *Am. J. Manag. Care.* 10:S3-S11.
- Vignozzi L, Morelli A, Filippi S, Ambrosini S, Mancina R, Luconi M, Mungai S, Vannelli GB, Zhang XH, Forti G, Maggi M. (2007) Testosterone regulates RhoA/Rhokinase signaling in two distinct animal models of chemical diabetes. *J. Sex. Med.* 4:620-630.
- Villalba N, Kun A, Stankevicius E, Simonsen U. (2010) Role for tyrosine kinases in contraction of rat penile small arteries. *J. Sex. Med.* En Prensa.
- Villalba N, Stankevicius E, García-Sacristán A, Simonsen U, Prieto D. (2007) Contribution of both  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization to the 1-adrenergic vasoconstriction of rat penile small arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292:H1157-H1169.
- Virag R, Bouilly P, Frydman D. (1985) Is impotence an arterial disorder? A study of arterial risk factors in 440 impotent men. *1:181-184.*
- Vogalis F, Sanders KM. (1990) Cholinergic stimulation activates a non-selective cation current in canine pyloric circular muscle cells. *J. Physiol.* 429:223-236.

- Vrentzos GE, Paraskevas KI, Mikhailidis DP. (2007) Erectile dysfunction: a marker of early coronary heart disease. *Hellenic J. Cardiol.* 48:185-191.
- Walker RL, Hume JR, Horowitz B. (2001) Differential expression and alternative splicing of TRP channel genes in smooth muscles, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: C1184-C1192.
- Wamhoff BR, Bowles DK, Owens GK. (2006) Excitation-Transcription Coupling in Arterial Smooth Muscle. *Circ. Res.* 98:868-878.
- Wang H, Eto M, Steers WD, Somlyo AP, Somlyo AV. (2002) RhoA-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization in erectile function. *J. Biol. Chem.* 277:30614-30621.
- Wang R, Karpinski E, Pang PK. (1989) Two types of calcium channels in isolated smooth muscle cells from rat tail artery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 256:H1361-H1368.
- Wang R, Liu YY, Anand-Srivastava MB. (1996) Hyperglycaemic-related abnormal calcium mobilization and vasocontraction from non-diabetic and diabetic rats. *J. Hypertens.* 14:S94.
- Wang R, Wu Y, Tang G, Wu L, Hanna ST. (2000) Altered L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents in vascular smooth muscle cells from experimental diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278:H714-H722.
- Wang SQ, Song LS, Lakatta EG, Cheng H. (2001)  $\text{Ca}^{2+}$  signaling between single L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature.* 410:592-596.
- Wang YX, Kotlikoff MI. (2000) Signalling pathway for histamine activation of nonselective cation channels in equine tracheal myocytes. *J. Physiol.* 523:131-138.
- Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE. (2002) Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ. Res.* 90:248-250.
- Wessells H, Teal TH, Engel K, Sullivan CJ, Gallis B, Tran KB, Chitaley K. (2006) Fluid shear stress-induced nitric oxide production in human cavernosal endothelial cells: inhibition by hyperglycaemia. *BJU Int.* 97:1047-1052.
- White RE, Carrier GO. (1990) Vascular contraction induced by activation of membrane calcium ion channels is enhanced in streptozotocin-diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253:1057-1062.
- White TA, Xue A, Chini EN, Thompson M, Sieck GC, Wylam ME. (2006) Role of transient receptor potential C3 in TNF-alpha-enhanced calcium influx in human airway myocytes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35:243-251.
- Wijetunge S, Aalkjaer C, Schachter M, Hughes AD. (1992) Tyrosine kinase inhibitors block calcium channel currents in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:1620-1623.
- Wijetunge S, Hughes AD. (1996) Activation of endogenous c-Src or a related tyrosine kinase by intracellular (pY) EEI peptide increases voltage-operated calcium channel currents in rabbit ear artery cells. *FEBS Lett.* 399:63-66.
- Wijetunge S, Hughes AD. (2007) Src family tyrosine kinases mediate contraction of rat isolated tail arteries in response to a hyposmotic stimulus. *J. Hypertens.* 25:1871-1878.
- Wijetunge S, Lymn JS, Hughes AD. (1998) Effect of inhibition of tyrosine phosphatases on voltage-operated calcium channel currents in rabbit isolated ear artery cells. *Br. J. Pharmacol.* 124:307-316.
- Williams BA, Liu C, Deyoung L, Brock GB, Sims SM. (2005) Regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release in corpus cavernosum smooth muscle: synergism between nitric oxide and cGMP. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288:C650-C658.

- Wilson DP, Susnjar M, Kiss E, Sutherland C, Walsh MP. (2005) Thromboxane A<sub>2</sub>-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem. J.* 389:763-774.
- Wingard C, Fulton D, Husain S. (2007) Altered penile vascular reactivity and erection in the Zucker obese-diabetic rat. *J. Sex. Med.* 4:348-362.
- Wingard CJ, Lewis R, Mills TM. (2001) Erection and NO override the vasoconstrictive effect of alpha-adrenergic stimulation in the rat penile vasculature. *Int. J. Impot. Res.* 13:212-220.
- Wingard CJ, Moukdar F, Prasad RY, Cathey BL, Wilkinson L. (2009) Reversal of voltage-dependent erectile responses in the Zucker obese-diabetic rat by rosuvastatin-altered RhoA/Rho-kinase signaling. *J. Sex. Med.* 6:269-278.
- Wojcikiewicz RJ. (1995) Type I, II, and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types. *J. Biol. Chem.* 270:11678-11683.
- Woodsome TP, Eto M, Everett A, Brautigan DL, and Kitazawa T. (2001) Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca<sup>2+</sup> sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J. Physiol.* 535:553-564.
- Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS. (2006) Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 174:803-813.
- Xie D, Kontos CD, Donatucci CF, Annex BH. (2005) Cholesterol feeding reduces vascular endothelial growth factor signaling in rabbit corporal tissues. *J. Sex. Med.* 2:634-640.
- Xie Z, Su W, Guo Z, Pang H, Post SR, Gong MC. (2006) Up-regulation of CPI-17 phosphorylation in diabetic vasculature and high glucose cultured vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 69:491-501.
- Xiong Z, Sperelakis N, Fenoglio-Preiser C. (1994) Regulation of L-type calcium channels by cyclic nucleotides and phosphorylation in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *J. Vasc. Res.* 31:271-279.
- Xiong Z, Sperelakis N. (1995) Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27:75-91.
- Xu SZ, Beech DJ. (2001) TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in native vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 88:84-87.
- Xu SZ, Boulay G, Flemming R, Beech DJ. (2006) E3-targeted anti-TRPC5 antibody inhibits store-operated calcium entry in freshly isolated pial arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291:H2653-H2659.
- Xuan YT, Wang OL, Whorton AR. (1992) Thapsigargin stimulates Ca<sup>2+</sup> entry in vascular smooth muscle cells: nicardipine-sensitive and insensitive pathways. *Am. J. Physiol.* 262:C1258-C1265.
- Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. (1996) Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:156-160.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 332:411-415.
- Yang L, Doshi D, Morrow J, Katchman A, Chen X, Marx SO. (2009) Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate Cav1.2 alpha(1c). *Biochemistry.* 48:6674-683.

- Yang L, Liu G, Zakharov SI, Morrow JP, Rybin VO, Steinberg SF, Marx SO. (2005) Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J. Biol. Chem.* 280:207-214.
- Yang ZQ, Barrow JC, Shipe WD, Schlegel KA, Shu Y, Yang FV, Lindsley CW, Rittle KE, Bock MG, Hartman GD, Uebele VN, Nuss CE, Fox SV, Kraus RL, Doran SM, Connolly TM, Tang C, Ballard JE, Kuo Y, Adarayan ED, Prueksaritanont T, Zrada MM, Marino MJ, Graufelds VK, DiLella AG, Reynolds IJ, Vargas HM, Bunting PB, Woltmann RF, Magee MM, Koblan KS, Renger JJ. (2008) Discovery of 1,4-substituted piperidines as potent and selective inhibitors of T-type calcium channels. *J. Med. Chem.* 51:6471-6477.
- Yeromin AV, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD. (2004) A store-operated calcium channel in *Drosophila* S2 cells. *J. Gen. Physiol.* 123:167-182.
- Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD. (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature.* 443:226-229.
- Ying Z, Jin L, Palmer T, Webb RC. (2006) Angiotensin II up-regulates the leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF), a regulator of G protein signaling domain-containing RhoGEF, in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 69:932-940.
- Yip H, Chan WY, Leung PC, Kwan HY, Liu C, Huang Y, Michel V, Yew DT, Yao X. (2004) Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries. *Histochem. Cell Biol.* 122:553-561.
- Yoo HJ, Kozaki K, Akishita M, Watanabe M, Eto M, Nagano K, Sudo N, Hashimoto M, Kim S, Yoshizumi M, Toba K, Ouchi Y. (1997) Augmented  $Ca^{2+}$  influx is involved in the mechanism of enhanced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Atherosclerosis.* 131:167-175.
- Yu JZ, Zhang DX, Zou AP, Campbell WB, Li PL. (2000) Nitric oxide inhibits  $Ca^{2+}$  mobilization through cADP-ribose signaling in coronary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279:H873-H881.
- Yu Y, Sweeney M, Zhang S, Platoshyn O, Landsberg J, Rothman A, Yuan JX. (2003) PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284:C316-C330.
- Yusufi A, Cheng J, Thompson M, Chini E, Grande J. (2001) NAADP elicits specific microsomal  $Ca^{2+}$  release from mammalian cells. *Biochem. J.* 353:531-536.
- Zahradnik I, Gyorke S, Zahradnikova A. (2005) Calcium activation of ryanodine receptor channels-reconciling RyR gating models with tetrameric channel structure. *J. Gen. Physiol.* 126:515-527.
- Zeng X, Keyser B, Li M, Sikka SC. (2005) T-type ( $\alpha 1G$ ) low voltage-activated calcium channel interactions with nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and regulation of calcium homeostasis in human cavernosal cells. *J. Sex. Med.* 2:620-630.
- Zhang AY, Yi F, Tegatz EG, Zou AP, Li PL. (2004) Enhanced production and action of cyclic ADP-ribose during oxidative stress in small bovine coronary arterial smooth muscle. *Microvasc. Res.* 67:159-167, 2004.
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD. (2005) STIM1 is a  $Ca^{2+}$  sensor that activates CRAC channels and migrates from the  $Ca^{2+}$  store to the plasma membrane. *Nature.* 437:902-905.



- Zhao W, Christ GJ. (1995) Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction. II. Calcium mobilization in cultured human corporal smooth muscle cells. *J. Urol.* 154:1571-1579.
- Zhong J, Dessauer CW, Keef KD, Hume JR. (1999) Regulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rabbit portal vein by G protein  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits. *J. Physiol.* 517:109-120.
- Zhong J, Hume JR, Keef KD. (1999) Anchoring protein is required for cAMP-dependent stimulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rabbit portal vein. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 277:C840-C844.
- Zhou C, Wu S. (2006) T-type calcium channels in pulmonary vascular endothelium. *Microcirculation.* 13:645-656.
- Zhou J, Launikonis BS, Rios E, Brum G. (2004) Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in mammalian and amphibian muscle. An RyR isoform-specific role in excitation-contraction coupling? *J. Gen. Physiol.* 124:409-428.
- Zimpelmann J, Burns KD. (2001) Angiotensin II AT2 receptors inhibit growth responses in proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281:F300-F308.
- Zoghbi ME, Copello JA, Villalba-Galea CA, Velez P, Dia Sylvester PL, Bolanos P, Marcano A, Fill M, Escobar AL. (2004) Differential  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Sr}^{2+}$  regulation of intracellular divalent cations release in ventricular myocytes. *Cell Calcium.* 36:119-134.
- Zorzato F, Fujii J, Otsu K, Phillips M, Green NM, Lai FA, Meissner G, MacLennan DH. (1990) Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265:2244-2256.

## **VIII. SUMMARY AND CONCLUSIONS**



The contracted state of corpus cavernosum and arterial smooth muscle determines the maintenance of penile flaccidity, whereas its relaxation allows the filling of the sinuses and an initial rise in intracavernosal pressure that leads to erection (Andersson and Wagner, 1995). Nitric oxide (NO) released from nonadrenergic-noncholinergic (NANC) nerve endings and endothelial cells upon sexual stimulation is considered to be the main mediator of erection (Andersson and Wagner, 1995; Simonsen et al., 1997; Prieto et al., 1998; Simonsen et al., 2002). Accordingly, endothelial dysfunction and reduced availability of NO in vascular diseases such as hypertension, hypercholesterolemia, and diabetes mellitus are often associated with erectile dysfunction, and enhancement of NO-mediated relaxations by selective inhibitors of phosphodiesterase 5 constitutes the basis of current oral treatments successfully used for organic impotence (Moreland et al., 2001). During the flaccid state, erectile tissue is contracted by the release of neural and local factors, such as norepinephrine, thromboxane A<sub>2</sub>, neuropeptide Y and endothelin-1 that increase smooth muscle cytosolic Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and/or Ca<sup>2+</sup> sensitization through activation of G protein-coupled receptors (Andersson and Wagner, 1995; Simonsen et al., 2002; Prieto et al., 2004). Tonic physiological activity of RhoA/Rho kinase is also involved in the regulation of erectile function and the maintenance of penile flaccidity (Chitaley et al., 2001).

Erectile dysfunction is currently considered as an early clinical manifestation of a more generalized vascular disease due to its high prevalence in patients with cardiovascular risk factors including diabetes, hypertension, hyperlipidemia, and tobacco abuse (Sullivan et al., 1999; Montorsi et al., 2003). Erectile dysfunction is a common complication and an important cause of decreased quality of life in men with diabetes, and its prevalence is three times higher in type 1 and type 2 diabetic patients than in the general population (Hakim and Goldstein, 1996; Vickers and Wright, 2004). About 50% of these patients exhibit suboptimal responses to oral phosphodiesterase 5 inhibitors (Vickers and Wright, 2004; Vardi, 2009).

Growing epidemiological evidence associates the subsequent risk of erectile dysfunction with the presence of risk factors for coronary artery disease such as obesity, hypertension, and dyslipidemia (Montorsi et al., 2003; Montorsi et al., 2006). On the other hand, the rate of erectile dysfunction in patients with

coronary artery disease is as high as 42–57%, and the incidence of erectile dysfunction in diabetic patients with silent ischemia is 34.8% versus 4.7% in those without silent ischemia (Gazzaruso et al., 2004; Montorsi et al., 2003; Montorsi et al., 2006). This has recently led to the suggestion that erectile dysfunction could be a potential marker for silent coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus patients (Gazzaruso et al., 2004; Montorsi et al., 2006).

Elevation of free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  allows arterial vasoconstriction, and agonists binding  $\alpha_1$ -adrenoceptors activate a G protein-coupled pathway to stimulate both  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from intracellular stores and  $\text{Ca}^{2+}$  entry from extracellular fluid (Berridge, 2003). However, in many resistance vessels a sustained rise in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) is mainly generated via agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry through both dihydropyridine-sensitive L-type and non-L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (McFadzean and Gibson, 2002; Sanders, 2001).  $\text{Ca}^{2+}$  entry through non-L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels may in turn include voltage-independent store (SOC)- and receptor (ROC)-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (McFadzean and Gibson, 2002). Elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in vascular smooth muscle (VSM) cells is considered a classic trigger for force development in smooth muscle through activation of myosin light chain (MLC) kinase (MLCK) and subsequent phosphorylation of the 20-kDa regulatory myosin light chain ( $\text{MLC}_{20}$ ), resulting in shortening of VSM. Regulation of the activity of MLC phosphatase (MLCP) mediates the myofilaments sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  (Somlyo and Somlyo, 2000). Phosphorylation of the MYPT1 subunit of MLCP inhibits its activity, increasing the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the contractile apparatus for a given  $[\text{Ca}^{2+}]$ . It is well established that MLCP can be inhibited via activation of the small G protein RhoA. On activation, RhoA translocates to the membrane where it activates Rho kinase, which can inhibit MLCP by phosphorylation of MYPT1 (Feng et al., 1999). Recent studies have shown relevant mechanisms of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization involving RhoK in the contraction of corpus cavernosum smooth muscle and that the NO-cGMP pathway can modulate  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity to elicit relaxation (Takahashi et al., 2001; Wang et al., 2002). Whereas several physiological issues concerning innervation, receptors,  $\text{K}^+$  channels, gap-junctions and local factors which regulate penile smooth muscle tone are well established (Andersson and Wagner, 1995; Prieto et al., 1998; Simonsen et al.,

2002), the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mechanisms underlying the vasoconstriction of erectile tissue are poorly understood.

The purpose of the present study was four-fold: 1) To investigate the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mechanisms coupled to the  $\alpha_1$ -adrenoceptor- and to the thromboxane receptor (TP)-mediated vasoconstriction in rat penile small arteries; 2) To assess the role of Rho kinase in both  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization and in the modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  entry through plasma membrane; 3) To establish an animal model for a direct assessment of  $\text{Ca}^{2+}$  handling in the penile diabetic vasculopathy by determining vascular structure and reactivity of penile arteries compared to coronary arteries in the obese Zucker rat; 4) To determine whether impaired  $\text{Ca}^{2+}$  signaling may contribute to the vascular dysfunction of prediabetic penile arteries.

In order to clarify these aims we used first- or second-order branches of the rat dorsal penile artery from Wistar rats (12-14 wk), and second-order branches of the left descending coronary arteries and dorsal penile arteries from obese Zucker rats (OZR) and their control counterparts [lean Zucker rats (LZR)] (17-18 wk). In these vessels, studies of vascular reactivity with/without simultaneous measurements of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels were performed. Western blot analysis was used to determinate the total protein expression as well as immunohistochemistry to study the presence and distribution of proteins on stained arterial cross sections. Determination of lumen, media, and vessel areas was performed by morphometric analysis.

**The main findings of this study were:**

1. The  $\alpha_1$ -adrenergic and TP-mediated vasoconstriction of rat penile arteries is coupled to  $\text{Ca}^{2+}$  entry through voltage-dependent L-type and receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels with a minor role of  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from intracellular stores.
2. Rho-kinase is involved in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  entry through receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels activated by  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation, but not by TP activation.

3. Passive depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores revealed a capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in penile arteries neither coupled to contraction nor Rho-kinase-mediated.
4. The  $\alpha_1$ -adrenergic vasoconstriction in penile arteries involves  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization mechanisms mediated by protein kinase C, tyrosine kinase, and Rho-kinase.
5. TP-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization under TP activation in erectile tissue involves phosphorylation of the MYPT1 subunit of MLCP through Rho-kinase.
6. In penile arteries from obese Zucker rats we found a correlation between vascular remodeling and endothelial dysfunction, whereas structure was preserved in coronary arteries despite a developing endothelial dysfunction depicted by an impaired NO basal production.
7. In both penile arteries and coronary arteries from animals with Metabolic Syndrome vasoconstriction is augmented in part due to impairment of basal NO release and the effect of oxidative stress.
8. A mayor role for Rho-kinase-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization coupled to  $\alpha_1$ -adrenergic vasoconstriction at the expense of reduced  $\text{Ca}^{2+}$  influx is found in penile arteries from obese Zucker rats in contrast to LZR.

Final conclusion:

In summary, under situations of vascular risk,  $\text{Ca}^{2+}$  handling is impaired in penile arterial tissue with an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization mechanisms coupled to  $\alpha_1$ -adrenergic vasoconstriction at the expense of reduced  $\text{Ca}^{2+}$  influx, probably shifted to cell growth and proliferation processes of arterial wall. A crucial role for Rho-kinase during this change places Rho-kinase inhibitors as an alternative therapeutic target for erectile dysfunction. On the other hand, the severity of the structural and functional abnormalities in penile arteries during Metabolic Syndrome might anticipate the vascular dysfunction of the coronary vascular bed and reinforces the current clinical concept that considers erectile dysfunction as a clinical manifestation of both endothelial dysfunction and

cardiovascular disease, suggesting that erectile dysfunction could be considered as an early sign of other severe vascular pathologies.



